

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultado de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Administración pre-reperfusión del agonista
de receptores adrenérgicos beta-3
"mirabegron" en un modelo porcino de infarto:
efecto sobre tamaño de infarto, remodelado
ventricular y función cardiaca**

Antonio Piñero Lozano

Dirigida por:

Prof. Jerónimo Farré Muncharaz

Dr. Borja Ibáñez Cabeza

Dr. Felipe Navarro del Amo

Madrid, 2017

A mis padres

A Silvia, Hugo y Jorge

AGRADECIMIENTOS

Son tantos los agradecimientos que tendría que hacer, que realmente no se por donde empezar. Voy a hacer un gran esfuerzo de síntesis.

A mi mujer y mis hijos. Silvia, gracias por tu paciencia, comprensión y amor. Sabes que sin ti esta tesis no sería posible. Hugo, hijo mío, gracias por haberme hecho más fuerte y mejor persona. Jorge, hijo mío, gracias por la felicidad que me produce tu llegada.

A mis padres por ser el pilar fundamental de todo lo que soy. Gracias por vuestro apoyo incondicional. Todo este trabajo es posible gracias a vosotros. Mamá, gracias por haber creído en mí desde pequeño.

A todas las personas que han contribuido a mi formación como cardiólogo, en especial a mi maestro el Profesor Jerónimo Farré. Jerónimo, has marcado cada etapa de mi formación y eres uno de los artífices más importantes de que esté donde estoy. Gracias por tu apoyo profesional, pero también por el personal. Como te he comentado en varias ocasiones "es de bien nacido ser agradecido".

A Felipe Navarro por TODO. Felipe, gracias por haberme apoyado en todo momento, por tus consejos, tus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una mejor persona. Pero más que nada gracias por tu amistad.

A Borja Ibáñez por su apoyo incondicional. Borja, eres la persona a la que debo poder escribir estas líneas. Gracias por motivarme, por tu amistad y por darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba.

A Miguel Orejas por su ayuda desinteresada. Miguel, gracias por tu apoyo y ayuda en toda mi trayectoria profesional y, sobre todo, personal.

Al departamento de Cardiología Intervencionista de la Fundación Jiménez Díaz. A los que estuvieron (Dr Córdoba, Pepe, Carmen, Sagrario, Agustín y Pedrito) y a los que están (Juan, Roberto, Dani, Jorge, Juan Carlos, Mar y Nati).

A mis compañeros del servicio de Cardiología de la Fundación Jiménez Díaz. Mención especial para José Manuel, Pepa y Rosa.

A Xavier Rosselló, Rodrigo Fernández y a todo el equipo del CNIC que ha hecho posible este trabajo.

A todos los que olvido.

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 Infarto agudo de miocardio como problema socio-económico	13
2.2 Resonancia magnética como herramienta de investigación en el contexto del IAM	15
2.3 Modelo porcino de infarto agudo de miocardio.....	19
2.4 Isquemia y perfusión	23
2.4.1 Introducción	23
2.4.2 Fisiopatología de la lesión por I/R	24
2.4.3 Terapias para reducir la lesión isquémica	31
2.4.4 Terapias para reducir la lesión por perfusión	35
2.4.5 Fármacos con resultados prometedores en estudios piloto y de fase 2	40
2.4.6 Ejemplos de la larga lista de ensayos clínicos fallidos para reducir la lesión de perfusión	45
2.5 Receptores Beta 3 Adrenérgicos	46
2.5.1 Síntesis catecolaminérgica y circulación	47
2.5.2 Catecolaminas en el fracaso cardíaco	48
2.5.3 Señalización beta adrenérgica en el sistema cardiovascular	48
2.5.4 Receptores betaadrenérgicos en el corazón debilitado	50
2.5.5 Receptores beta 3 adrenérgicos (B3ar).....	51
2.5.6 Nuestro trabajo	57
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1 Fase 1: Estudio de dosis/respuesta.....	62
4.1.1 Descripción del procedimiento	62
4.1.2 Efectos adversos y criterios de punto final	64
4.1.3 Diseño experimental	64
4.2 Fase 2: Estudio de los efectos cardioprotectores de la administración pre-reperfusión de mirabegron en el modelo porcino de Infarto de Miocardio.	67
4.2.1 Descripción del procedimiento	67
4.2.2 Efectos Adversos y Criterios de Punto Final	69
4.2.3 Destino final de los animales.....	70
4.2.4 Fármaco (mirabegron)	71
4.2.5 Diseño experimental	71

4.2.6 Resonancia Magnética Cardíaca.....	73
5. RESULTADOS	82
5.1 Estudio de dosis/respuesta	83
5.2 Estudio de los efectos cardioprotectores de la administración pre-reperusión de Mirabegron en el modelo porcino de Infarto de Miocardio	86
6. DISCUSIÓN	93
6.1. Justificación de usar otro agonista B3.....	94
6.2. Posibles razones por las que los resultados del BRL37344 han sido positivos en estudios previos y los del Mirabegron neutros en nuestro estudio a pesar de ser igualmente un B3 agonista.	95
6.2.1 El producto y su administración vía intravenosa.	95
6.2.2 Afinidad por el receptor B3.....	96
6.2.3 Diferencias en el agonismo B2.	97
6.2.4 Variaciones en el modelo porcino de infarto	99
6.2.5 Operadores diferentes a la hora de realizar el procedimiento de isquemia en el modelo porcino.	101
6.2.6 Tamaño muestral	101
6.3 Importancia de los estudios negativos (tanto tesis como artículos de revista)	102
6.4 ¿Y ahora qué? El futuro del uso del Mirabegron	105
7. CONCLUSIÓN	106
8. REFERENCIAS	108

1. RESUMEN

Antecedentes y objetivos: El infarto agudo de miocardio (IAM) es la causa más frecuente de mortalidad a nivel mundial. La mortalidad intrahospitalaria asociada IAMCEST (Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST) ha descendido tras la implementación de las estrategias de reperfusión como tratamiento de elección, llegando a ser de entre el 5% y el 14%. Sin embargo, la mortalidad a largo plazo de los pacientes supervivientes a un infarto sigue siendo elevada, en torno al 12% a los 6 meses. Además de la mortalidad a largo plazo, muchos supervivientes de un infarto tienen un corazón dañado y tienen un elevado riesgo de reingresos por insuficiencia cardíaca. Esto conlleva no sólo una morbilidad alta para los propios pacientes, sino un coste muy alto para los sistemas sanitarios. La posibilidad de limitar la extensión de daño miocárdico irreversible durante un infarto resultará no sólo en una reducción adicional de la mortalidad asociada a este proceso, sino en una reducción importante de la morbilidad a largo plazo. Es por ello que la búsqueda de estrategias capaces de limitar la necrosis miocárdica durante un IAM es un objetivo prioritario de la investigación

Pese a muchos años de investigación en el campo, en la actualidad existen muy pocas estrategias capaces de limitar el tamaño del infarto más allá de la propia reperfusión.

En las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento de la relevancia del sistema beta-adrenérgico como modulador de la respuesta al daño agudo y crónico, siendo una diana terapéutica establecida. Estas estrategias se han dirigido principalmente al bloque de los receptores beta adrenérgicos tipo 1 y 2.

Más recientemente, se ha identificado un tercer isotipo de receptores beta adrenérgicos (β_3 AR). Inicialmente se identificó en tejidos periféricos, como la grasa y la vejiga urinaria, pero hace poco ha sido descubierto en el músculo cardíaco. Estudios previos han mostrado que

la administración muy precoz (antes de la reperfusión) de fármacos selectivos específicos de los β 3AR puede ser beneficiosa en términos de reducción del tamaño del infarto (García-Prieto et al. Basic Res Cardiol 2013). Sin embargo el tipo de agonistas β 3AR usado en estos estudios preclínicos era un compuesto de investigación no trasladable a pacientes.

Como se ha comentado previamente, el músculo liso de la vejiga urinaria expresa β 3AR, donde la estimulación de éstos resulta en una relajación del músculo detrusor. Esta propiedad ha servido para desarrollar el uso de fármacos agonistas selectivos de β 3AR como tratamiento de la vejiga hiper-reactiva. De hecho existe un agonista selectivo β 3AR (MIRABEGRON) que está comercializado con la indicación del tratamiento de la vejiga neurógena.

Dado que mirabegron está aprobado para uso humano, su uso durante un infarto agudo de miocardio podría resultar beneficioso en términos de reducción del tamaño del infarto. Esta hipótesis es lógica ya que previamente otros compuestos agonistas β 3AR han demostrado su eficacia, y el mirabegron está aprobado para su uso clínico.

En esta tesis hemos testado la hipótesis de que la administración precoz de mirabegron durante un infarto experimental resultará en una reducción del tamaño del infarto. Si este trabajo preclínico es positivo, esta estrategia se podría trasladar rápido a humanos por ser un fármaco ya aprobado para uso humano (aunque con otra indicación).

Nuestro objetivo es analizar el efecto de la infusión de la pre-reperfusión de mirabegron sobre el tamaño del infarto, el remodelado ventricular y la función cardíaca en un modelo de Isquemia Reperfusión.

Métodos y resultados: Este estudio se ha realizado en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio, con evaluación de tamaño de

infarto y función cardíaca mediante uso de resonancia magnética en diferentes tiempos después del infarto. El modelo consiste en la oclusión de la arteria coronaria del cerdo durante 45 minutos. Primero se realizó un estudio dosis/respuesta y a continuación se realizó el estudio de los efectos cardioprotectores de la administración pre-reperusión de mirabegron. En este trabajo se utilizaron cerdos machos castrados de raza Large-White, procedentes de la granja del CNIC.

Se les realizó un Infarto Agudo de Miocardio mediante oclusión de la arteria Descendente Anterior.

Los grupos experimentales del estudio fueron 2:

Grupo 1: recibieron en el minuto 40 de isquemia (5 minutos antes de la reprefusión) la dosis de agonista β 3AR establecida como óptima en el ensayo piloto, por vía intravenosa.

Grupo 2: recibió placebo en el minuto 40 de isquemia

A los animales se les realizó una resonancia magnética cardíaca en los días 5-7 post-IAM. Posteriormente los animales fueron enviados de vuelta a la granja, donde estuvieron hasta el día 45 post-IAM aproximadamente, cuando regresaron al CNIC para hacerse una nueva resonancia magnética cardíaca y posterior sacrificio.

En el día 7 el tamaño del infarto fue del $35,0 \pm 6,0\%$ del ventrículo izquierdo en el grupo del Mirabegron vs el $35,9 \pm 7,1$ ($p=0,78$) en el del placebo. La fracción de eyección fue del $36,3 \pm 3,3$ en el grupo del mirabegron vs $34,6 \pm 5,7$ ($p=0,43$) en el del placebo.

En el día 45 el tamaño del infarto fue del $23,7 \pm 6,3\%$ del ventrículo izquierdo en el grupo del Mirabegron vs el $25,2 \pm 4,5$ ($p=0,58$) en el del placebo. La fracción de eyección fue del $33,1 \pm 5,7$ en el grupo del mirabegron vs 30 ± 7 ($p=0,37$) en el del placebo. El índice de miocardio

salvado fue de $37,9 \pm 17,8$ en el grupo de Mirabegron vs $33 \pm 13,8$ en el grupo del placebo.

Conclusión: En general podemos decir que la administración pre-reperusión de Mirabegron no redujo el tamaño de infarto (a 7 días ni a 45) así como tampoco mejoró la función ventricular ni el remodelado a 45 días. Pese a que el estudio ha salido neutro (no se ha conseguido demostrar la hipótesis planteada) creo que es de gran importancia. La publicación (en forma de tesis doctoral y posteriormente como artículo científico) de estudios donde no se cumple la hipótesis inicial (estudios “negativos”) es de una importancia capital para evitar el sesgo de publicación positiva y para ayudar a la comunidad científica a avanzar en el conocimiento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Infarto agudo de miocardio como problema socio-económico

El infarto agudo de miocardio (IAM) es la causa más frecuente de mortalidad a nivel mundial, con más de 3.5 millones de muertes anuales. En Europa, uno de cada seis hombres y una de cada siete mujeres morirán a causa de un infarto agudo de miocardio (1). El IAM con ascenso del segmento ST (IAMCEST) es el resultado de una oclusión brusca de una arteria coronaria. La incidencia del IAMCEST en los países occidentales ha disminuido durante las últimas décadas debido a la implementación progresiva de terapias preventivas y un mejor control de los factores de riesgo (2). A pesar de la disminución progresiva y gradual de su incidencia, el IAMCEST sigue siendo un importante problema de salud, que representa un importante factor de mortalidad / morbilidad en todo el mundo (2).

Como hemos comentado el IAMCEST es el resultado de una oclusión brusca de una arteria coronaria. Si la oclusión coronaria se mantiene en el tiempo, el área de miocardio irrigada por esta coronaria queda necrosada. Tanto el tamaño de la necrosis miocárdica (masa de miocardio infartado) como la función sistólica residual determinada por la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) se han mostrado como predictores muy importante de eventos adversos futuros (3-5). De hecho, los infartos extensos tienen mucha más mortalidad no sólo a corto, sino a medio y largo plazo, por lo que el tamaño del infarto es el principal factor determinante de eventos adversos futuros (6).

Tras demostrarse que la trombosis coronaria es la causa (no el resultado) del IAMCEST en la gran mayoría de los casos, la restauración del flujo sanguíneo al miocardio isquémico (reperusión) se convirtió en el tratamiento estándar para estos pacientes. La

reperusión demostró rápidamente unos efectos tan benéficos cuales son: limitar el tamaño del infarto, mejorar la función miocárdica a largo plazo, cambiar el patrón de cicatrización de la zona infartada y, lo que es más importante, reducir la mortalidad.

Por lo tanto, la mortalidad intrahospitalaria asociada IAMCEST ha descendido desde el uso de la reperusión precoz como tratamiento de elección, llegando a ser de entre el 5% y el 14%. Sin embargo, la mortalidad a largo plazo de los pacientes supervivientes a un infarto sigue siendo elevada, en torno al 12% a los 6 meses (7,8). Los pacientes de alto riesgo, entre los que se encuentran los que sufren infartos más grandes que producen mayor disfunción ventricular, tienen un pronóstico aún peor. Estos motivos justifican la existencia de una búsqueda muy intensa de intervenciones que sean capaces de limitar la necrosis miocárdica durante un IAM, convirtiéndose en un objetivo prioritario de la investigación cardiovascular actual (9). Si exceptuamos la reperusión precoz, pocas terapias han logrado reducir la mortalidad y mejorar el pronóstico a largo plazo de los pacientes con infarto. Pero los supervivientes a un IAMCEST están en riesgo de nuevos eventos clínicos, tales como insuficiencia cardíaca, arritmias malignas o muerte súbita (10,11). La explicación es simple: los pacientes con una función cardíaca gravemente deprimida no habrían sobrevivido la fase aguda del STEMI en el pasado, pero con la llegada de la reperusión, ahora sobreviven al episodio índice y viven con un corazón significativamente dañado (12). De hecho, el IAMCEST es uno de los principales contribuyentes a la insuficiencia cardíaca crónica. La fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida después del infarto es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca crónica (ICC) en todo el mundo (13). En los pacientes con ICC diferentes terapias farmacológicas y no farmacológicas (desfibrilador automático implantable-DAI) han logrado reducir la mortalidad. Sin embargo, estas terapias suelen suponer un coste económico elevado, lo que impide su universalización. El tratamiento crónico de la insuficiencia cardíaca representa una enorme carga

socioeconómica tanto para los pacientes como para los sistemas nacionales de salud. Por tanto, urge la necesidad de encontrar terapias menos costosas que consigan prevenir la aparición de disfunción ventricular tras el infarto de miocardio (14,15). En conclusión: el gran éxito de las terapias de reperfusión ha dado lugar a un cambio de paradigma en la investigación clínica en el campo del IAMCEST: la atención ya no se limita a reducir la mortalidad (ya muy baja), sino también a abordar la consecuencia del aumento de supervivencia: insuficiencia cardíaca post-infarto.

2.2 Resonancia magnética como herramienta de investigación en el contexto del IAM

La resonancia magnética (RM) es una prueba exhaustiva, precisa y cada vez más disponible para evaluar a los pacientes con cardiopatía isquémica y para guiar la terapia (41). Se trata de la técnica de imagen más precisa para calcular la función del ventrículo izquierdo y el tamaño de infarto en pacientes con cardiopatía isquémica (16).

Desde un punto de vista técnico, la resonancia es una herramienta que utiliza campos magnéticos para la adquisición de imágenes. Las bases físicas de esta técnica tienen gran complejidad, pero las podemos simplificar del siguiente modo:

En el interior del organismo hay millones de átomos con sus correspondientes núcleos que están compuestos por protones y electrones que rodean al núcleo. El protón tiene una carga positiva y da vueltas sobre sí mismo, es decir tiene un espín (*spin*). Como la carga positiva se mueve con el protón, cada protón genera una corriente eléctrica que va acompañada de un pequeño campo magnético; en otras palabras, cada protón puede ser visto como un

imán. Cuando el paciente es introducido en un imán de gran potencia (3 Tesla en nuestro caso que equivale a 60.000 veces el campo magnético de la tierra), los protones se alinean con ese campo magnético externo y, además del espín, tienen un movimiento alrededor del eje mayor del campo magnético externo (movimiento de precesión); de forma gráfica, el movimiento del protón en ese momento es como el de una peonza al lanzarla al suelo, gira sobre sí misma y sobre un eje vertical al suelo. La mayoría de los protones se alinea en la dirección del campo magnético del imán del equipo y aunque algunos se alinean en sentido contrario, el efecto neto es que los protones del paciente crean un campo magnético que tiene la misma dirección que la del imán del equipo (magnetización longitudinal), por lo que no puede medirse directamente. Entonces, el equipo emite una ráfaga de pulsos de radiofrecuencia para cambiar la dirección del campo magnético de los protones al transmitirles energía. Al enviar pulsos de radiofrecuencia estamos transfiriendo energía a los protones (fenómeno de resonancia), de tal forma que la magnetización longitudinal disminuye y aparece una magnetización transversal. Cuando la ráfaga de pulsos de radiofrecuencia cesa, los fenómenos de magnetización vuelven a la situación inicial. Así, la magnetización longitudinal aumenta de nuevo (relajación longitudinal, que se describe por el tiempo de relajación longitudinal, T_1) y la magnetización transversal disminuye y desaparece (relajación transversal, que se describe por el tiempo de relajación transversal, T_2). En general, T_1 es más largo que T_2 , y el agua y los tejidos con alto contenido líquido tienen tiempos de relajación más largos que la grasa. Los pulsos de radiofrecuencia se diferencian por la cantidad de energía que transfieren a los protones, es decir, por el grado de relajación provocado. Así, los pulsos se definen por la capacidad de desviar los protones desde su posición inicial medida en ángulos.

Una secuencia en RM consta, generalmente, de varios pulsos de radiofrecuencia que además pueden ser diferentes entre sí. La

diferencia entre unas secuencias y otras depende del tipo de pulsos de radiofrecuencia utilizados y del tiempo que hay entre ellos. Al combinar estas variables se obtienen secuencias cuyo resultado puede ser diferenciar sobre todo los tejidos según su T1 (imágenes potenciadas en T1) o según su T2 (imágenes potenciadas en T2). Por último, hay secuencias que potencian la imagen de tejidos con alta densidad de protones.

El receptor del equipo de RM capta los cambios en la magnetización que se producen en los protones después de haber recibido la energía de los pulsos de radiofrecuencia. Es decir, capta la relajación longitudinal y transversal de los protones. La información obtenida directamente de la relajación de los protones se denomina matriz de datos crudos (*raw data matrix*) o espacio k, que no es más que una reja de puntos que debe transformarse mediante la ecuación de Fourier para obtener una imagen interpretable (17).

El diseño de secuencias con diferentes pulsos de radiofrecuencia y diferentes gradientes magnéticos, nos da la capacidad de evaluar el corazón tanto desde un punto de vista estático/morfológico (caracterización tisular) como funcional (movimiento). En este aspecto, el corazón supone un reto único para la técnica de resonancia. Debido al movimiento inherente al latido del corazón, las secuencias de adquisición cardíaca deben optimizar tanto la resolución espacial (tamaño de la estructura más pequeña que puede diferenciar) como la resolución temporal (mínimo tiempo que representa cada imagen) evitando además la aparición de artefactos. Este reto es aún mayor en los imanes de alto campo, como es el caso de los 3 Tesla (18).

La RM se considera una técnica diagnóstica muy segura (19). Los principales riesgos son derivados de la introducción de un objeto o material ferromagnético en la sala de exploración y por lo tanto evitables. A diferencia de las técnicas que utilizan radiación, la exposición de los pacientes a energía de resonancia magnética utilizada en la clínica no se ha asociado con el desarrollo futuro de cáncer.

La RM es especialmente útil en el contexto de la cardiopatía isquémica, ya que es capaz de evaluar parámetros con importante valor pronóstico, como son la función sistólica del ventrículo izquierdo (principalmente la fracción de eyección) y la cantidad de tejido dañado por el insulto isquémico (tamaño del infarto) (20). La RM posee una precisión diagnóstica única en este contexto. Asimismo, es capaz de caracterizar otros procesos que acontecen en el corazón infartado: edema miocárdico, perfusión miocárdica alterada, hemorragia intrainfarto u obstrucción microvascular. Esta información, además de su valor clínico en cuanto a diagnóstico y pronóstico, posee un enorme valor en la investigación de terapias cardioprotectoras.

Para la determinación de la perfusión miocárdica, el tamaño del infarto y la obstrucción microvascular se utiliza un medio de contraste intravenoso basado en el gadolinio, que se compone del ion Gd^{3+} y un quelante que evita su toxicidad (21). Este contraste mejora la señal de la imagen principalmente por su capacidad para acortar los tiempos de relajación T1 y T2 de los tejidos. Tiene una distribución extracelular no específica y ha sido aprobado para numerosas aplicaciones médicas (22). La incidencia de efectos adversos es muy baja, siendo mucho menor que en el caso de los medios de contraste yodados utilizados en la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y en la coronariografía invasiva. Los efectos adversos graves ocurren en menos de un 0.01% de los pacientes, con una mortalidad menor al 0.0001% (23). El riesgo de nefrotoxicidad utilizando las dosis aprobadas es prácticamente nulo y el raro síndrome de fibrosis sistémica nefrogénica asociado al contraste con gadolinio ha sido descrito en pacientes con insuficiencia renal avanzada o trasplante hepático (24).

La resonancia magnética cardíaca es una técnica no invasiva que no utiliza radiaciones ionizantes. Posee unas excelentes resolución espacial y resolución temporal, que le aportan una gran reproducibilidad y exactitud diagnóstica. Gracias a estas características, se ha convertido en el "gold standard" para la caracterización funcional y tisular del corazón tras el IAM, tanto en el terreno clínico como en el de la investigación.

2.3 Modelo porcino de infarto agudo de miocardio

Existe una gran dificultad en el estudio directo de procesos patológicos asociados a fallo cardíaco sobre pacientes humanos. Por ello se han desarrollado en las últimas décadas distintos modelos animales para el estudio de aspectos fisiopatológicos de los procesos que con mayor frecuencia originan dicho fallo cardíaco: enfermedad coronaria, hipertensión, enfermedad cardíaca valvular, cardiomiopatía dilatada y enfermedad miocárdica.

El modelo animal nos permite investigar su biología o comportamiento, así como diferentes procesos patológicos, inducidos o espontáneos. Estos procesos patológicos (como la isquemia miocárdica), en uno o más aspectos, pueden reflejar las mismas características que en humanos. Parece evidente que la elección cuidadosa de la especie a emplear como modelo es una de las decisiones más importantes que hay que tomar antes del inicio de una investigación.

Parece claro, por tanto, que para predecir la utilidad clínica de distintos fármacos antes de su empleo en humanos aquejados de isquemia miocárdica son necesarios estudios realizados *in vivo* con modelos animales. Por otra parte, su empleo en estudios de metabolismo cardíaco proporciona una importante información referida a mecanismos bioquímicos y efectos de fármacos experimentales imposibles de obtener con modelos *in vitro* de corazón aislado.

En investigación cardiovascular se han empleado como modelos animales pequeños y grandes de distintas especies. El uso de perros, ovejas y cerdos permite investigar la funcionalidad cardíaca y los cambios morfológicos y estructurales del corazón de manera mucho más exacta que los modelos animales basados en el uso de especies de menor tamaño.

Pero para entender mejor lo mencionado anteriormente, pongamos un ejemplo. En un escenario clínico típico, un paciente de edad media avanzada tiene varios factores de riesgo, comorbilidades y medicación asociada. Además tiene una circulación coronaria que ya ha sufrido un remodelado funcional y estructural antes del IAMCEST (Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST) (25). El individuo afectado puede o no tener una circulación colateral desarrollada, un historial de episodios de angina prodrómica que pueden inducir protección por el condicionamiento isquémico (26) o una microembolizaciones coronarias previas que hayan producido microinfartos. El IAMCEST suele iniciarse por la ruptura súbita de una placa aterosclerótica y la oclusión más o menos completa de una arteria coronaria epicárdica, muy a menudo seguida de reperfusión espontánea o intervencionista, pero a veces sin reperfusión. Debido a que todos estos factores contribuyen al tamaño final del infarto, es evidente que ningún modelo animal puede emular exactamente un escenario clínico. Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre el infarto de miocardio se deriva de estudios en animales anestesiados, jóvenes y sanos sometidos a oclusión coronaria repentina y reperfusión. Los modelos animales son fundamentales para comprender la fisiopatología humana, pero la información obtenida con cualquier modelo en particular sólo puede resolver una parte del rompecabezas. Por lo tanto, no existe un modelo animal superior, y cada uno tiene sus usos. Los modelos de roedores ayudan a identificar posibles mecanismos, pero sus enormes diferencias anatómicas / fisiológicas de los seres humanos hacen que sea imprudente extrapolar los resultados al entorno clínico. Los ensayos clínicos piloto sólo se justifican cuando se encuentran beneficios sólidos e indiscutibles en los modelos de animales grandes, con una concordancia mucho más estrecha con la anatomía y la fisiología humanas. La historia de la medicina cardiovascular está llena de experiencias clínicas fallidas causadas por tomar atajos de este camino de traslación.

VALOR DE LOS MODELOS DE INFARTO MIOCÁRDICO EN ANIMALES PEQUEÑOS

Los ratones son cada vez más utilizados en estudios experimentales de infartos por su facilidad de reproducción, su bajo costo y la disponibilidad de modelos transgénicos. Sin embargo, la traducción de los resultados es muy limitada debido a su alta frecuencia cardíaca y el pequeño tamaño de sus corazones. Esto asegura que le continúe llegando oxígeno y nutrientes por difusión a las capas internas del miocardio durante la oclusión coronaria. Por lo tanto, el infarto en los ratones se desarrolla dentro de los 45 a 90 minutos (27,28), pero no se infarta más del 70% del ARA incluso con una oclusión coronaria permanente (28). Los roedores generalmente tienen una frecuencia cardíaca más alta que los mamíferos más grandes, pero mientras que las ratas y los conejos tienen poco flujo sanguíneo colateral y progresión rápida del infarto (29), las cobayas tienen un flujo sanguíneo colateral importante y muy poca progresión del infarto. También se encuentran diferencias significativas en la respuesta al infarto de miocardio a través de diferentes cepas de ratones. Dependiendo del antecedente genético el tamaño del infarto después del mismo procedimiento puede variar en un 30% (30).

MODELOS DE INFARTO DE MIOCARDIO EN ANIMALES GRANDES

Los animales grandes son el paso obligatorio antes de iniciar ensayos en seres humanos. Entre los mamíferos más grandes, los cerdos y los primates tienen poca circulación colateral, mientras que los gatos y especialmente los perros tienen una considerable circulación colateral innata (31). En los cerdos el infarto comienza después de 15 a 35 minutos de la oclusión coronaria y se propaga de tal manera que,

después de 60 a 180 minutos, el infarto está completo y afecta a más del 80% del AAR (32,33). La tolerancia a la I / R (isquemia/reperfusión) varía notablemente entre diferentes cepas de cerdo. Los primates muestran una sorprendente resistencia al infarto, con poco o ningún infarto evidente después de 40 a 60 min de oclusión coronaria, e incluso después de 90 minutos de oclusión, el tamaño del infarto es menor que el de los cerdos (34). En los perros el infarto es en gran parte subendocárdico después de 40 min de oclusión coronaria y progresa para afectar aproximadamente el 70% del AAR después de 6 h, pero incluso la oclusión permanente deja una pequeña zona de miocardio viable en el subepicardio (35). Dado el flujo sanguíneo colateral variable pero significativo en perros, el tamaño del infarto se cuantifica mejor como una fracción del AAR y por su relación inversa con el flujo sanguíneo residual (36). El desarrollo del infarto en los seres humanos parece ser más lento que en estos grandes mamíferos. Gracias al análisis de la RMC (Resonancia Magnética Cardíaca) con contraste (37,38) y la cantidad de miocardio isquémico salvable en el momento de la reperfusión (39,40), se puede estimar que alrededor del 30% al 50% del AAR permanece viable después de 4 a 6 h desde el inicio de los síntomas anginosos. Incluso después de 12 h de oclusión coronaria la reperfusión intervencionista puede limitar significativamente el tamaño del infarto (41). Esta progresión más lenta del infarto en los seres humanos que en los mamíferos mayores puede estar relacionada con una circulación colateral bien desarrollada (cercana a la de los perros) (42), una resistencia específica al infarto como en primates (34), episodios de angina preinfarto que protegen por preconditionamiento isquémico (43), algún grado de hibernación a corto plazo con adaptación contráctil y metabólica al flujo sanguíneo reducido (44,45), o medicación de fondo, especialmente con inhibidores plaquetarios (46).

Aparte de las diferencias entre modelos animales, hay otros factores importantes que deben tenerse en cuenta al realizar estudios

preclínicos y, lo que es más importante, al comparar resultados de diferentes modelos o incluso de diferentes laboratorios. Por ejemplo, la hora del día en que I / R ocurre tiene una influencia significativa en la tolerancia del corazón a I / R. Después de la demostración inicial en ratones, este fenómeno también se ha observado en pacientes (47). De manera similar, la estación e incluso el día de la semana podrían tener un efecto sobre los resultados observados en los modelos animales y, finalmente, en la respuesta a las terapias protectoras.

2.4 Isquemia y reperfusión

2.4.1 Introducción

Una gran cantidad de evidencias experimentales y clínicas apoyan la noción de que la reperfusión induce daño adicional al miocardio, conocido como lesión por reperfusión. Como resultado, el daño infligido al miocardio durante un IAMCEST se define mejor como la lesión por isquemia / reperfusión (I / R), resultado de los procesos isquémicos y de reperfusión. La lesión miocárdica de I / R es un fenómeno complejo que involucra a muchos elementos, todo lo cual contribuye al daño final infligido al corazón.

Después del gran éxito que ha cosechado las terapias para reducir la lesión isquémica ha llegado el momento de centrar los esfuerzos en terapias para reducir la lesión por reperfusión, pero en los últimos años pocas intervenciones han pasado con éxito la fase de prueba de concepto

En este apartado vamos a describir las terapias evolutivas para el tratamiento de la lesión miocárdica I / R. Estos incluyen terapias dirigidas tanto a la isquemia, como al daño por reperfusión. Para explicar la justificación de la búsqueda de nuevas y mejores terapias,

describimos la fisiopatología de la lesión de I / R miocárdica y la trayectoria de investigación traslacional, desde la fase de descubrimiento preclínico, pasando por los ensayos clínicos de prueba de concepto hasta grandes ensayos con el objetivo de cambiar la práctica clínica. En el contexto que estamos tratando el término infarto de miocardio siempre se refiere al IACEST.

2.4.2 Fisiopatología de la lesión por I/R

CONSIDERACIONES GENERALES

Tras la oclusión de una arteria coronaria epicárdica el miocardio previamente perfundido por la arteria ocluida está en peligro. La zona miocárdica hipoperfundida durante el infarto de miocardio se conoce como área en riesgo (AER). Si no se reperfunde rápidamente la arteria coronaria y no hay circulación colateral, la mayor parte del AER se convierte en necrótica. Dado que muchos pacientes reciben una terapia de reperfusión oportuna, parte del AER permanece libre de necrosis: el llamado miocardio salvado. Las características morfológicas típicas del infarto de miocardio reperfundido son bandas de contracción, hinchazón y disrupción mitocondrial, así como disrupción de la membrana de los cardiomiocitos, acompañada de destrucción microvascular, hemorragia intersticial e inflamación (48,49). Los estudios experimentales identificaron los determinantes del tamaño del infarto de miocardio como: 1) el tamaño del AER (50); 2) la duración de la isquemia miocárdica (35,51) 3) la cantidad de flujo sanguíneo residual a través de colaterales (35,50); 4) la temperatura del tejido durante la isquemia; Y 5) la situación hemodinámica durante la isquemia (52). El parámetro hemodinámico más notable es la frecuencia cardíaca, que determina no sólo la demanda miocárdica, sino también el flujo sanguíneo coronario (53); Sin embargo, la hemodinámica sólo influye en el tamaño del infarto de un modo

limitado, por lo que el tamaño del infarto se determina en gran parte por la falta de suministro de sangre / energía y menos por la demanda miocárdica, que se reduce significativamente por la falta de contracción regional.

Los estudios originales de Maroko et al. (54) y Ginks et al. (55) hace 40 años demostraron por primera vez que la reperfusión salva al miocardio del infarto, y estos estudios iniciaron el exitoso camino de la terapia de reperfusión (56).

El potencial de la reperfusión para inducir una lesión adicional secundaria al daño isquémico surgió poco después con la identificación del aturdimiento como una forma reversible de lesión por reperfusión miocárdica (57). Aunque la contribución de la lesión por reperfusión al tamaño final del infarto se ha cuestionado en el pasado, hoy se acepta que la reperfusión puede inducir un daño adicional al miocardio. Esta opinión está respaldada por una fuerte evidencia de que las intervenciones aplicadas al final del período isquémico (es decir, coincidiendo con la reperfusión) pueden reducir el tamaño del infarto. Ya se había reconocido a mediados de los años ochenta que la reperfusión lenta a baja presión producía un edema significativamente menor y un tamaño de infarto menor que la reperfusión abrupta estándar a presión normal (58). Esta idea fue desarrollada posteriormente por Zhao et al. (59), que demostraron una reducción del tamaño del infarto por breves episodios de reoclusión / restablecimiento de flujo coronario en el momento de la reperfusión, una estrategia denominada postcondicionamiento isquémico (60). Debido a que estas intervenciones se aplican al final del período isquémico no pueden reducir el tamaño del infarto reduciendo el daño isquémico y, por lo tanto, deben reducir el daño relacionado con la reperfusión. De estas observaciones se desprende no sólo que la lesión por reperfusión contribuye al tamaño del infarto, sino también que todas las estrategias de condicionamiento que protegen el miocardio y

reducen el tamaño del infarto actúan sólo en conjunción con una posible reperfusión (14,61,62).

EL PAPEL DE LA MICROCIRCULACIÓN EN EL TAMAÑO DEL INFARTO DESPUÉS DEL IAMCEST

La microcirculación coronaria es un actor crítico en el fenómeno complejo de la I / R miocárdica. La red de microcirculación es la interfase entre el vaso epicárdico y los cardiomiocitos. Así, no importa cuán eficientemente y rápidamente se restaure el flujo sanguíneo a la arteria epicárdica, que, si hay una obstrucción microvascular (OMV), el tejido miocárdico permanecerá sin perfusión eficiente. La OMV (también denominado fenómeno de no reflujo) durante I / R es un factor importante en el tamaño del infarto final y es un predictor independiente de morbilidad / mortalidad (63). El fenómeno de no reflujo se caracterizó primero por Kloner et al. (49,64) en perros sometidos a 90 minutos de oclusión coronaria y posterior reperfusión. La microcirculación coronaria de estos animales mostró un daño capilar severo, las células endoteliales notablemente hinchadas y rotas, trombosis intraluminal, estando rodeada la microcirculación de cardiomiocitos hinchados e irreversiblemente lesionados. En la clínica, el fenómeno de no reflujo se observa en 10% a 30% de los pacientes con IAMCEST reperfundido (65,66) a pesar de la recanalización exitosa de las arterias coronarias epicárdicas. La OMV en estos pacientes se detecta angiográficamente a partir de flujo lento o nulo del medio de contraste o por resonancia magnética cardíaca (CMR). La OMV se desarrolla en los primeros minutos de la reperfusión (67,68) y persiste durante al menos una semana (69,70). La OMV generalmente se limita al miocardio infartado (51,64); Sin embargo, no se ha excluido sistemáticamente la existencia de fenómenos de no reflujo dentro del AER, pero fuera del área infartada. En particular, la OMV puede

perjudicar el lavado de equivalentes de reducción y deshidrogenasas que son obligatorios para la delineación válida del tejido infartado mediante tinción con TTC, lo que contribuye a la infraestimación del tamaño del infarto (71). También se observa una disminución del flujo sanguíneo coronario fuera del AAR, pero esto no refleja un fenómeno de no reflujo, sino que es el resultado de la vasoconstricción coronaria alfa-adrenérgica refleja (72-74).

Se han propuesto una serie de mecanismos contribuyentes a la OMV: 1) embolización de partículas desecho de la ruptura de la lesión aterosclerótica responsable, con obstrucción física de la microcirculación coronaria (75); 2) agregados de plaquetas y plaquetas / leucocitos que se liberan o llegan con el flujo sanguíneo, donde se forman como parte del estado inflamatorio general asociado con IAMCEST (76); 3) vasoconstricción intensa inducida por sustancias vasoconstrictoras solubles liberadas en la lesión culpable (77,78); 4) compresión microvascular coronaria extravascular por edema en el miocardio circundante (79); Y 5) destrucción física primaria del endotelio capilar (64). Estos diferentes mecanismos no son mutuamente excluyentes y pueden actuar de forma conjunta y su contribución individual a la alteración de la reperusión miocárdica puede variar temporalmente y espacialmente. La lesión irreversible de los cardiomiocitos y la microcirculación coronaria están íntimamente relacionadas (80). La alta presión intramiocárdica, con una contribución predominante del edema, podría ser la causa principal de la OMV en la capa endocárdica, mientras que la microembolización podría ser la base de la expansión del infarto en la zona fronteriza (81). Sin embargo, actualmente no hay evidencia que apoye el papel causal de la obstrucción coronaria microvascular en el infarto de miocardio, aunque es hipotéticamente posible argumentar que la ausencia de perfusión tisular eficiente en áreas de OMV mantendrá la isquemia muscular y contribuirá así a la expansión del infarto.

El papel de los leucocitos en el desarrollo del infarto de miocardio es una cuestión dudosa: la infiltración de leucocitos puede ser más importante para la cicatrización y remodelación del infarto que para la determinación del tamaño del infarto (82). Sin embargo, la contribución potencial de los leucocitos intravasculares a la OMV y el tamaño del infarto merece más atención.

El infarto de miocardio y la OMV parecen ser actualmente fenómenos paralelos que comparten un mecanismo patológico similar: un déficit energético primario y posterior formación excesiva de especies reactivas de oxígeno tras la reperfusión. Por lo tanto, no es sorprendente que el postcondicionamiento reduzca no sólo el tamaño del infarto de miocardio, sino también la OMV (59,70).

NECROSIS, APOPTOSIS, AUTOFAGIA O NECROPTOSIS DE LOS CARDIOMIOCITOS: ¿IMPORTA LA FORMA DE MORIR?

El infarto de miocardio ha sido tradicionalmente visto como una manifestación de la muerte celular necrótica, pero recientemente, diferentes formas de muerte de cardiomiocitos se han identificado durante I / R, cosa que puede contribuir al tamaño final del infarto.

La necrosis se caracteriza morfológicamente por bandas de contracción miofibrilar, mitocondrias hinchadas y rotas, destrucción de las membranas de los cardiomiocitos, destrucción microvascular, hemorragia e inflamación. La mayoría de estas características morfológicas se agravan y se manifiestan por la reperfusión (35,51,83-85). Se cree que la necrosis es el resultado de mecanismos fisiopatológicos no regulados y no coordinados. Durante la isquemia la acidosis desarrollada de la glucólisis anaeróbica aumenta la afluencia de Na^+ a través del intercambiador Na^+ / H^+ , y la acumulación intracelular de Na^+ se incrementa por la inhibición de la Na^+ / K^+ -ATPasa debido a la falta de ATP disponible (86,87). El subsiguiente

intercambio de Na^+ por Ca^{++} por el funcionamiento en modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ induce la sobrecarga intracelular de Ca^{++} . Tras la reperfusión, la rápida normalización del pH y la renovación de la energía en el contexto de un elevado Ca^{++} citosólico induce la liberación oscilatoria y la recaptación de Ca^{++} en el retículo sarcoplásmico, causando un exceso incontrolado de hipercontracción miofibrilar (87-89). La normalización del pH ácido también activa la calpaína, que digiere el citoesqueleto y el sarcolema (90). Las altas concentraciones citosólicas de Na^+ y Ca^{++} dan como resultado edema intracelular cuando la osmolaridad extracelular se normaliza rápidamente mediante reperfusión. Por último, el exceso de formación de especies reactivas de oxígeno contribuye a la ruptura sarcolémica (91). A la necrosis sigue de forma habitual una respuesta inflamatoria.

A diferencia de la necrosis, la apoptosis, la autofagia y la necroptosis son procesos regulados mediante mecanismos específicos de transducción de señales subyacentes (92,93). La apoptosis es una forma de muerte celular que consume energía, caracterizada por rupturas de la cadena de ácido desoxirribonucleico que se identifican mediante la tinción con ácido desoxirribonucleico y / o la desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP. La apoptosis puede iniciarse extrínsecamente mediante la activación de receptores sarcolémicos, en particular FAS y receptores del factor de necrosis tumoral α (94), o intrínsecamente por liberación mitocondrial de citocromo c , que inicia una cascada de activación de caspasa conduciendo a una proteólisis intracelular, típicamente sin respuesta inflamatoria (93). Un acontecimiento central en el inicio de la muerte celular apoptótica es la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (95). El MPTP es un megacanal de gran conductancia, que se cierra en condiciones fisiológicas, pero se abre en respuesta a concentraciones aumentadas de calcio, fosfato inorgánico, o especies de oxígeno reactivo y a una disminución del

potencial interno de membrana mitocondrial, estando todas estas circunstancias presentes en el miocardio I / R (96,97). La formación y apertura del MPTP da como resultado el hinchamiento de la matriz mitocondrial, conduciendo finalmente a la ruptura de la membrana externa y a la liberación del citocromo c al citosol, donde activa la cascada de caspasas. Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl interactúan con la MPTP (98).

La autofagia es un proceso regulado de degradación lisosomal y reciclado de proteínas, incluyendo las proteínas mitocondriales (mitófago) (99). La autofagia se caracteriza por la presencia de vesículas de doble membrana (autofagosomas) y el aumento de la expresión de beclin-1, cadena ligera 3, el gen 5-12 relacionado con la, p62 y parkina, siendo los dos últimos esenciales para la mitofagia (100). De manera algo paradójica, la muerte celular por autofagia se considera protectora en lugar de perjudicial (101). Por ejemplo, en cerdos sometidos a 45 minutos de oclusión coronaria y reperusión, el supuesto inductor de autofagia cloramfenicol redujo el tamaño del infarto (102). Sin embargo, el papel de la autofagia en la lesión miocárdica I / R en humanos sigue siendo polémico (103,104).

La necroptosis comparte características con necrosis y apoptosis, pero se regula de forma distinta por la activación de las proteínas quinasas 1 y 3 que interactúan con el receptor (105) y puede ser inhibida por sustancias como la necrostatina (106).

En la actualidad no está claro hasta qué punto la necrosis, la apoptosis, la autofagia y la necroptosis son procesos mutuamente excluyentes y en qué medida contribuye al tamaño del infarto. Las características típicas de la apoptosis (tinción terminal de desoxinucleotidil transferasa dUTP) y autofagia (expresión característica de proteínas) se encuentran en la zona de infarto definida por tinción TTC, que tradicionalmente se ha considerado necrótica. La apertura del MPTP

parece ser decisiva para la necrosis, la apoptosis y la necroptosis, y las mitocondrias son también decisivas en la mitofagia / autofagia. La importancia de las formas reguladas de muerte de los cardiomiocitos en la lesión I / R probablemente esté más relacionada con sus mecanismos específicos de transducción de señales. El reconocimiento de los diferentes modos de muerte de cardiomiocitos durante el infarto sugiere la posibilidad de identificar objetivos terapéuticos que puedan modular estos procesos. Desde la perspectiva clínica, la muerte de cardiomiocitos es igualmente relevante independientemente del mecanismo que la produzca.

2.4.3 Terapias para reducir la lesión isquémica

Cuatro estudios históricos publicados hace más de 30 años, 2 experimentales y 2 clínicos, cambiaron el curso del tratamiento con STEMI en menos de una década, lo que condujo al enorme desarrollo de estrategias para reducir la lesión isquémica.

1. La demostración de una progresión espacial de la necrosis durante un infarto. Reimer et al. (35,51) sometieron perros anestesiados a una oclusión coronaria de diversas duraciones e informaron de la progresión de un frente de onda de necrosis miocárdica a partir de las capas subendocárdicas centrales, donde la isquemia es más severa, a los límites laterales menos isquémicos del AAR y el subepicardio.
2. La demostración de reducción del tamaño del infarto con la reperfusión. Maroko et al. (54) y Ginks et al. (55) demostraron por primera vez la existencia de miocárdico salvado por la reperfusión a las 3 h después de la oclusión coronaria ("el tiempo es músculo").
3. La demostración inequívoca de que la trombosis coronaria está presente en la mayoría de los casos de IAMCEST. DeWood et al. (107)

informaron de los hallazgos angiográficos detallados en pacientes estudiados poco después del inicio del IAMCEST.

4. La primera experiencia con la administración de trombolíticos intracoronarios (estreptoquinasa), según lo informado por Chazov et al. (108) y posteriormente, en un grupo mayor de pacientes, por Rentrop et al. (109).

Las conclusiones alcanzadas, aunque obvias hoy en día, fueron revolucionarias cuando se publicaron estos estudios. Ahora damos por sentado que el IAMCEST está provocado generalmente por una oclusión trombótica aguda de una arteria coronaria epicárdica y que la recanalización rápida de la arteria ocluida salva el miocardio isquémico, pero todavía viable. Hace treinta años, muchos pensaban que estas nociones eran heréticas.

El desarrollo de la reperusión como terapia para limitar el daño isquémico durante el IAMCEST es una de las mayores historias de éxito en el tratamiento de la enfermedad humana. Antes de que se estableciera este paradigma, la mortalidad temprana era del 20%; Por ejemplo, la tasa de mortalidad en el grupo control del ensayo GISSI-1 (Gruppo Italiano per Lo Studio of the Streptochinasi nell'Infarto Miocardio) fue del 18% (110). Esta cifra ha disminuido desde entonces hasta alcanzar el 5% en ensayos clínicos aleatorios recientes que se centran en la revascularización farmacológica, la revascularización mecánica o ambas. Aparte de la reperusión en sí, la reducción progresiva en el tiempo entre el diagnóstico de STEMI y la reperusión ha hecho una importante contribución a esta reducción de la mortalidad. Siguiendo el principio de "el tiempo es el músculo", se han hecho grandes esfuerzos para asegurar una reperusión temprana. Actualmente se acepta ampliamente que el acortamiento del tiempo de puerta balón (el tiempo entre el primer contacto médico y la reperusión mecánica) produce un mayor rescate del miocardio y

mejores resultados. El gran esfuerzo multidisciplinario realizado ha dado como resultado un descenso significativo de los tiempos de puerta balón en los últimos 10 años en todos los registros. Sin embargo, a pesar de estas mejoras, un gran estudio en EE. UU. de casi 100.000 pacientes con STEMI encontró que la mortalidad intrahospitalaria se ha mantenido sin cambios, indicando la necesidad de intervenir en otros componentes del tiempo isquémico total (111) y otros factores que contribuyen al tamaño del infarto.

REPERFUSION POR INTERVENCIÓN CORONARIA PERCUTÁNEA PRIMARIA, TROMBOLISIS O AMBAS.

La reperfusión es la terapia más eficaz desarrollada contra el daño isquémico durante el IAMCEST. Las técnicas farmacológicas, mecánicas y combinadas de reperfusión se han perfeccionado a lo largo de los años, avanzando enormemente su eficacia mediante el desarrollo de terapias adyuvantes. El uso de agentes líticos en ensayos controlados con placebo fue crucial en la elucidación de los beneficios de la reperfusión sostenida. El primer ensayo a gran escala para mostrar definitivamente una reducción significativa en la mortalidad por reperfusión con la administración intravenosa de agentes trombolíticos fue el ensayo GISSI-1 (110). Este estudio fue seguido por otros ensayos históricos en el campo (112,113).

Otra revolución en la búsqueda de terapias mejoradas para reducir el daño isquémico asociado al IAMCEST fue el uso de la reperfusión mecánica por la intervención coronaria percutánea (ICP). La ICP para IAMCEST (angioplastia primaria) se describió por primera vez como una intervención de rescate en los casos en los que la trombólisis no tuvo éxito. También se implementó ampliamente como terapia adyuvante de la trombólisis y se realizó sistemáticamente para evaluar la anatomía coronaria y la estenosis residual o electivamente en casos

de angina espontánea o inducible días después de la trombólisis exitosa. El uso de angioplastia primaria como alternativa a la trombólisis se describió por primera vez en 1983 (114).

Los muchos estudios que comparan estas estrategias no dejan duda de que la ICP primaria realizada por un equipo experimentado es superior a la terapia trombolítica intrahospitalaria (115). Además, el progreso en la terapia con los stents ha reducido notablemente la incidencia de trombosis aguda y tardía (116) y ha refinado la estrategia de ICP primaria. A pesar de las claras ventajas de la ICP sobre la trombólisis en las comparaciones directas, el escenario clínico es a veces más complicado. Aunque no se han realizado estudios prospectivos para demostrarlo, la ICP primaria puede no presentar una ventaja de mortalidad sobre la trombólisis inmediata cuando se realiza después de un retraso de 120 minutos. En algunos pacientes (aquellos que presentan rápidamente con un AER importante y un bajo riesgo de sangrado), este retraso máximo aceptable puede ser significativamente más corto (117).

Un enfoque ligeramente diferente desarrollado recientemente para los pacientes que no pueden recibir la ICP inmediata consiste en seguir la terapia trombolítica clásica y retrasar la ICP planificada entre 3 y 24 horas después de la administración fibrinolítica (esto difiere del abordaje facilitado en el que se realiza la ICP tan pronto como el paciente llega al centro PCI). En el ensayo STREAM (Strategic Reperfusion Early After Myocardial Infarction), la administración prehospitalaria de tenecteplase (media dosis en el anciano) a 2.000 pacientes con IAMCEST que no pudieron obtener PCI en 1 h resultó en tasas similar a la ICP primaria estándar para el compuesto de muerte, shock, insuficiencia cardíaca congestiva o reinfarto a los 30 días (118). Las tasas de mortalidad a un año en los dos grupos eran casi idénticas (119). Este enfoque debe ser más explorado en pacientes con tiempos largos de transporte al hospital con angioplastia primaria.

El uso de agentes antitrombóticos adyuvantes a la trombólisis se basa en el hecho de que la intensidad y la extensión neta de la trombólisis reflejan una competencia entre la lisis y la trombosis en curso (120). Pruebas convincentes de la eficacia de la aspirina como un agente adyuvante se adquirió por primera vez en el ensayo ISIS-2 (Segundo estudio internacional de supervivencia del infarto) (121), en el que los beneficios de la aspirina y la estreptoquinasa fueron aditivos. La aspirina también se ha utilizado como terapia adyuvante en IAMCEST en pacientes sometidos a reperusión por ICP primaria. Se obtienen beneficios clínicos adicionales al suplementar la aspirina con nuevos agentes antiplaquetarios como clopidogrel, ticagrelor o prasugrel. Dado el claro efecto beneficioso del tratamiento antiplaquetario óptimo en el IAMCEST, debe ser implementado en la prueba de cualquier estrategia cardioprotectora.

2.4.4 Terapias para reducir la lesión por reperusión

Aunque la historia de las terapias para reducir el daño isquémico, en su mayoría con terapia de reperusión, está llena de éxitos de rápida evolución, el desarrollo de terapias para reducir las lesiones por reperusión ha sido decepcionante. Esta disparidad refleja el contraste entre el problema directo planteado por la reducción de la lesión isquémica (restauración del flujo sanguíneo) y los procesos más complejos asociados con la lesión por reperusión.

LA LESIÓN LETAL POR REPERFUSIÓN ES UNA REALIDAD.

El término "lesión por reperusión" se ha utilizado durante muchas décadas para describir varios efectos asociados a la reperusión, algunos transitorios (por ejemplo, arritmias ventriculares, aturdimiento miocárdico, etc.) y otros permanentes (por ejemplo,

muerte inducida por reperfusión, conocida como lesión de reperfusión letal). La existencia de la lesión por reperfusión letal en el IAMCEST ha sido motivo de debate desde hace mucho tiempo (60,122). A pesar de la evidencia experimental convincente ya esbozada, la demostración clínica definitiva ha sido escasa. Esto se debe en parte a la brecha existente entre los modelos experimentales bien definidos y controlados, por un lado, y las pruebas de concepto en humano (es decir, modelos clínicos) y diseños de ensayos no claros por otro (123). Los hallazgos negativos en los ensayos clínicos de reducción del tamaño del infarto se acumularon, dando lugar a la idea, común entre los cardiólogos y en la industria farmacéutica, de que la lesión por reperfusión era una fantasía o, en el mejor de los casos, un artefacto de laboratorio. Estudios realizados a principios de los años noventa mostraron que la reperfusión no aumentó la extensión transmural del infarto en los corazones caninos, lo que sugiere una ausencia de lesión por reperfusión (124). Sin embargo, el perro es un caso particular en el que la lesión progresa lentamente y 90 a 180 minutos de oclusión coronaria pueden no provocar una lesión isquémica significativa; Se sabe que las lesiones isquémicas y de reperfusión están ligadas, determinando el grado de las primeras la extensión de las últimas. Desde entonces, la idea de lesión por reperfusión letal ha ganado aceptación progresiva sobre la base de pruebas procedentes de estudios clínicos y de ciencias básicas. La lesión por reperfusión letal puede definirse como una muerte potencialmente evitable de miocardio que era viable en el momento de la reperfusión y que es la consecuencia de eventos desencadenados o amplificados por la reperfusión. El hecho de que las maniobras preventivas como el postcondicionamiento limiten el tamaño del infarto sin afectar la lesión isquémica es la mejor demostración de la realidad de la lesión de reperfusión letal.

INTERVENCIONES NO FARMACOLÓGICAS PARA REDUCIR LA LESIÓN

POR REPERFUSIÓN.

El primer gran avance en las intervenciones no farmacológicas fue la definición de "precondicionamiento isquémico" por Murry et al. en 1986 (125), donde informaron que ciclos breves de isquemia y reperfusión realizados antes de una oclusión prolongada de la arteria coronaria con reperfusión posterior podrían reducir drásticamente el tamaño final del infarto en perros. Dado que el tiempo isquémico total estuvo inalterado (o incluso aumentado) por esta intervención, este estudio sugirió que podían haber más intervenciones para limitar el tamaño del infarto que simplemente una menor duración de la isquemia. Este hallazgo dio paso a un cambio de paradigma que estimuló la realización de trabajos de investigación, cuyos resultados han aumentado nuestra comprensión de la fisiopatología de la lesión I / R a nivel molecular, preparándose así para la identificación de nuevos objetivos dirigidos a la consecución de futuras terapias innovadoras. Muchos años después, se demostró que los efectos limitantes del infarto del precondicionamiento isquémico se deben en gran medida a una reducción de la lesión por reperfusión (126), aunque también es plausible que el precondicionamiento pueda reducir el daño isquémico. La impredecibilidad de la oclusión de la arteria coronaria en los pacientes con IAMCEST hace que el precondicionamiento isquémico no pueda ser aplicado en este entorno clínico, pero podría tener un papel importante en los procedimientos planificados como la cirugía cardíaca (14,26).

El segundo avance fue la descripción del "postcondicionamiento isquémico" de Zhao et al. (59) en 2003. Ellos mostraron que los episodios breves de isquemia y reperfusión, realizados inmediatamente después de la reperfusión tras una isquemia prolongada podrían reducir el tamaño final del infarto en perros entre 30% y 40%. Este efecto fue aún más sorprendente que el precondicionamiento, porque la intervención se aplicó después de la

reperusión; por lo tanto, no tiene relación con la duración de la isquemia o con cualquier evento asociado y debe relacionarse con la prevención de eventos que ocurren después de la reperusión. Con este simple experimento, este grupo demostró que la lesión por reperusión letal es una realidad (60), es bastante significativa en un entorno experimental (30% a 40% del tamaño final del infarto) y que es susceptible de intervención oportuna.

Con estos avances había llegado el momento de probar si la lesión de reperusión letal podría ser atenuada en los pacientes con IAMCEST. Los primeros en hacerlo fueron Staat et al. (127), quienes demostraron en 2005 que el postcondicionamiento isquémico puede reducir el tamaño del infarto en el STEMI. En este ensayo de prueba de concepto, el postcondicionamiento isquémico se aplicó 1 minuto después de la reperusión mediante inflado / desinflado del balón de angioplastia (baja presión, proximal al stent) en 4 ciclos de 1 min. El resultado fue una reducción del 36% del área bajo la curva para la liberación de creatina quinasa, un marcador sustituto del tamaño del infarto. La mayoría, no todos, de los pequeños ensayos realizados han demostrado una reducción del tamaño del infarto en los pacientes sometidos a postcondicionamiento (14).

Sin embargo, los dos mayores ensayos clínicos aleatorizados de postcondicionamiento en STEMI han sido neutrales. Por una parte está el ensayo POST ("Effects of Postconditioning on Myocardial Reperfusion in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction") (128). El protocolo de este ensayo permitió el uso discrecional de la trombectomía, la predilatación y otras maniobras. El inflado-desinflado del balón repetido en el sitio de la lesión culpable podría haber sido responsable de una microembolización excesiva inadvertida del trombo, como sugiere la baja tasa de resolución del segmento ST. Y, aunque el protocolo estableció el postcondicionamiento dentro del 1 minuto del IAMCEST, la alta frecuencia de trombectomía (50%)

probablemente retrasó el postcondicionamiento más allá del tiempo de protección de 1 minuto, y esto podría haber diluido los beneficios de esta estrategia de protección.

Por otra parte está el DANAMI 3-iPOST (estudio danés de tratamiento agudo óptimo de pacientes con infarto de miocardio ST-elevación-3) (NCT01435408). 1214 pacientes con STEMI se asignaron a 2 intervenciones: PCI convencional (implante inmediato de stent) vs postcondicionamiento (con implante de stent después del final de los ciclos de postcondicionamiento de 4 inflados de balón de 30 s separados por otros 30 segundos). Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni de mortalidad ni de hospitalización por ICC. El hecho de que los ensayos más grandes sean neutrales requiere prudencia en la interpretación de los efectos limitadores del infarto del postcondicionamiento. Se pone de relieve que la aplicación de esta estrategia en un escenario de la vida real es más difícil que en los ensayos de prueba de concepto, en los que la selección del paciente y la aplicación del protocolo están más controladas.

Otra forma de condicionamiento miocárdico bien descrito en modelos animales es el preconditionamiento isquémico remoto: el preconditionamiento realizado en un órgano distante (129). Es importante mencionar que el preconditionamiento isquémico a distancia (4-5 minutos de inflado del manguito de TA en arteria braquial durante el IAMCEST, es decir, durante la transferencia ambulatoria al centro PCI y antes de la reperfusión PCI) resultó en un aumento del miocardio salvado en comparación con la PCI habitual (130), y esto podría traducirse en menos eventos clínicos a largo plazo (131). Esta posibilidad debería confirmarse en el ensayo CONDI-2 (Efecto del RIC sobre Resultados Clínicos en Pacientes con IAMCT sometidos a pPCI) (NCT01857414).

INTERVENCIONES FARMACOLÓGICAS PARA REDUCIR EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

Durante los últimos 10 años, se han realizado muchos ensayos clínicos de fase II para encontrar intervenciones farmacológicas coadyuvantes para mejorar el daño miocárdico asociado al IAMCEST. Describiremos aquí las estrategias farmacológicas más prometedoras, así como ejemplos de la larga lista de fracasos.

2.4.5 Fármacos con resultados prometedores en estudios piloto y de fase 2

CYCLOSPORINE-A.

Debido a que las condiciones locales (anatomía coronaria, carga del trombo) pueden dificultar la aplicación del postcondicionamiento isquémico durante la PCI, los agentes farmacológicos que activan vías similares al condicionamiento isquémico han sido ampliamente investigados a nivel preclínico y luego traducidos a Ensayos clínicos piloto (132). La ciclosporina-A es el paradigma farmacológico como agente de postcondicionamiento. La ciclosporina-A actúa inhibiendo la activación del MPTP, circunstancia ésta observada también con el postcondicionamiento. Piot et al. (40) asignaron al azar a 58 pacientes para recibir un único bolo de ciclosporina A o placebo inmediatamente antes de la ICP. El tamaño del infarto, medido por el área bajo la curva de creatina quinasa, fue significativamente menor en el grupo de ciclosporina-A. Sin embargo, el ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado y controlado con placebo CIRCUS (Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction [MI] Patients; (NCT01502774)), que reclutó a 975 pacientes con STEMI anterior y los asignó al azar a bolo intravenoso de ciclosporina A o placebo ha

resultado negativo en su objetivo primario combinado (mortalidad total, hospitalización por insuficiencia cardíaca y remodelación del VI [aumento del volumen diastólico del VI > 15%]).

METOPROLOL

El efecto de los b-bloqueantes sobre el tamaño del infarto en los pacientes con IAMCEST ha sido intensamente debatido. Diferentes agentes b-bloqueantes fueron probados en muchos ensayos de IAMCEST en los años 1970 a 1980 sin conclusión definitiva sobre su efecto cardioprotector. Sin embargo, estos ensayos se realizaron antes de que se estableciera la reperfusión y no es sorprendente que los b-bloqueantes no mostraran un efecto de reducción en el tamaño del infarto, ya que, sin reperfusión, las posibilidades de recuperación del miocardio son insignificantes. En la era de la trombólisis como tratamiento estándar para IAMCEST, el primer ensayo clínico aleatorizado realizado mostró efectos neutros de atenolol intravenoso (IV) en el tamaño del infarto (133). Los datos preclínicos del modelo de infarto porcino demostraron que el metoprolol IV reduce muy significativamente el tamaño del infarto cuando se administra antes de la reperfusión (134,135). Contrariamente a la teoría clásica de la reducción del consumo de oxígeno miocárdico, se propone que el mecanismo responsable de este efecto limitador del infarto esté relacionado con una reducción de la lesión por reperfusión debido al efecto del metoprolol en las células circulantes (neutrófilos / plaquetas) en lugar de los cardiomiocitos (136). Esta evidencia preclínica condujo al ensayo METOCARD-CNIC (Efecto del Metoprolol en Cardioprotección durante un infarto agudo de miocardio), en el cual 270 pacientes con IAMCEST anteriores sometidos a ICP fueron asignados al azar a metoprolol IV o control antes de la reperfusión. Los infartos, medidos por RMC, fueron significativamente menores en el grupo de metoprolol

IV (37), y el efecto fue más pronunciado en los pacientes reclutados durante la transferencia de ambulancia al centro PCI (137). El seguimiento por RMC a los seis meses de más de 200 pacientes mostró que el grupo IV de metoprolol tenía una FEVI media significativamente más alta y además contaba con significativamente menos casos de disminución grave de la FEVI (138).

Los resultados alentadores del estudio METOCARD-CNIC parecen contradecir los hallazgos del ensayo más potente COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial). En este mega ensayo, los pacientes con IAMCEST sometidos a trombolisis fueron asignados al azar a metoprolol IV seguido de metoprolol oral o placebo. El ensayo COMMIT no adujo nada sobre el tamaño del infarto; Sin embargo, mostró tasas significativamente reducidas de reinfarto y fibrilación ventricular en respuesta a metoprolol IV, pero ello fue compensado por un exceso de shock cardiogénico, lo que resultó en un efecto neutro neto sobre la mortalidad (139). Sin embargo, el tratamiento de los pacientes en el ensayo COMMIT no fue óptimo de acuerdo con las directrices actuales. En primer lugar, los pacientes con IAMCEST recibieron tratamiento trombolítico tras diez horas de media después del inicio de los síntomas. La cantidad de miocardio que puede lograrse salvar después de 10 h de oclusión coronaria es residual en el mejor de los casos, especialmente cuando se usa trombólisis como estrategia de reperfusión (140). En segundo lugar, el ensayo COMMIT incluyó a pacientes con IAMCEST en Killip clase III, que recibieron el régimen completo de administración de metoprolol; éste resultó en una reducción relativa de la mortalidad del 5% y 2,5% en los pacientes de clase I y II de Killip, respectivamente, pero aumentó la mortalidad en un 19% en los pacientes de clase III de Killip. Por último, el metoprolol también aumentó la mortalidad en pacientes con presión arterial sistólica <120 mm Hg. Estos resultados refuerzan las contraindicaciones para el tratamiento con b-bloqueador IV en

pacientes con insuficiencia cardíaca manifiesta o comprometidos hemodinámicamente, que han sido excluidos sistemáticamente de otros estudios con b-bloqueantes.

En contraste con el COMMIT, el estudio METOCARD-CNIC reclutó a paciente con <6 h desde el inicio del IAMCEST, mientras que los pacientes con clase Killip III fueron excluidos. La población de pacientes en el estudio METOCARD-CNIC es, por lo tanto, más representativa del estándar actual de atención para los pacientes con IAMCEST. El estudio EARLY BAMI (Beta-blocker Administration before primary PCI in patients with ST-elevation Myocardial Infarction) (141) evaluó los efectos del metoprolol IV sobre la disminución del infarto en pacientes con IAMCEST reclutados durante la transferencia de ambulancia al centro PCI. Este estudio tiene un diseño similar al METOCARD-CNIC pero incluye pacientes con infartos de cualquier localización (METOCARD-CNIC reclutó sólo pacientes con STEMI anterior) y amplía la ventana de tiempo para el reclutamiento a 12 h (en comparación con 6 h en METOCARD-CNIC). El resultado de este estudio fue neutro, no observándose diferencias en el tamaño del infarto entre los dos grupos (metoprolol vs placebo). Por último, el ensayo clínico MOVE ON (Impact of pre-reperfusion Metoprolol On clinical eVEnts after myocardial infarctiON) responderá definitivamente si la mejora de la lesión I / R ejercida por el metoprolol IV (142) se traduce en un beneficio clínico real. Dado que no todos los b-bloqueantes tienen los mismos efectos intracelulares (debido a su disparidad de lipofilia entre otras diferencias) y ni siquiera comparten el mismo efecto mecanicista (a pesar de considerarse b1 selectivo), no debe suponerse que todos tendrán efectos similares protectores sobre el infarto.

MODULADORES DE GLUCOSA

El posible uso terapéutico de la glucosa para proteger los cardiomiocitos del agotamiento de la energía durante el infarto de miocardio fue propuesto hace varias décadas por Sodi Pallares et al. (143). La administración combinada de glucosa / insulina / potasio (GIK) durante el infarto de miocardio se ha probado en varios ensayos con algunos resultados alentadores. El ensayo IMMEDIATE (Immediate Myocardial Metabolic Enhancement During Initial Assessment and Treatment in Emergency Care) reclutó pacientes con sospecha de síndrome coronario agudo y los asignó al azar a GIK o placebo durante la transferencia al hospital. En el subgrupo de pacientes con IAMCEST, GIK redujo significativamente el tamaño del infarto evaluado por RMC (144). Sin embargo, estos resultados prometedores deben ser confirmados en un ensayo clínico prospectivo con potencia para detectar diferencias en el tamaño del infarto. Otro enfoque ha sido el uso de análogos del péptido-1 de tipo glucagón (GLP1). Después de resultados preclínicos prometedores, Lonborg et al. (145) asignaron al azar 172 pacientes con IAMCEST a recibir inyección IV del análogo a GLP1 exenatide o placebo. La cantidad de miocardio salvado visto en RMC fue significativamente mayor en el grupo de exenatide.

ABCIXIMAB

Los inhibidores de la glicoproteína IIb / IIIa se desarrollaron para la reducción de eventos trombóticos debido a su potente efecto sobre las plaquetas y los agregados de plaquetas-leucocitos implicados en la lesión I / R. El ensayo INFUSE-AMI reclutó 452 pacientes con IAMCEST anteriores sometidos a PCI y realizó una asignación al azar factorial 2 x 2 abierta para probar el efecto del abciximab y / o la trombectomía sobre el tamaño del infarto, evaluado por RMC. La aspiración de trombo no tuvo efecto sobre el tamaño del infarto, pero la administración intracoronaria de abciximab redujo significativamente el tamaño del infarto (146). Dado que el estándar actual de atención para los

pacientes con IAMCEST incluye el uso de potentes agentes antiplaquetarios orales, los inhibidores de la glicoproteína IIb / IIIa se dejan para una población seleccionada con IAMCEST.

2.4.6 Ejemplos de la larga lista de ensayos clínicos fallidos para reducir la lesión de reperfusión

Muchos ensayos clínicos han intentado y fracasado en demostrar la capacidad de una terapia dada para limitar el tamaño del infarto reduciendo la lesión por reperfusión. Un denominador común en muchos de estos fracasos es el beneficio débil o poco claro en la fase preclínica (147,148). A continuación comentamos una actualización sobre los ensayos negativos más recientes (además de los ya comentados).

La adenosina se ha evaluado en varios ensayos y no mostró un efecto claro limitador del tamaño del infarto. En los ensayos más recientes, la adenosina se administró por inyección intracoronaria a dosis altas, y su efecto sobre el tamaño del infarto se evaluó mediante CMR. La adenosina no tuvo ningún efecto sobre el tamaño del infarto ni sobre la OMV (149,150).

El efecto del óxido nítrico inhalado sobre el tamaño del infarto en 250 pacientes con IAMCEST sometidos a PCI fue recientemente probado en el ensayo NOMI (Nitric Oxide for inhalation to reduce reperfusion injury in acute STEMI) (151). La inhalación de óxido nítrico no redujo el tamaño del infarto evaluado por RMC.

El efecto del nitrito de sodio IV sobre el tamaño del infarto se evaluó en 229 pacientes con IAMCEST sometidos a ICP en el ensayo NIAMI (Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial) (152). Los autores no

encontraron ninguna diferencia en el tamaño del infarto evaluado por CMR.

El efecto de la TRO40303 intravenosa, un fármaco que se une a una diana molecular poco clara en la membrana mitocondrial externa, se ensayó en el MITOCARE (Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction) como coadyuvante a la intervención coronaria percutánea primaria para IAMCEST. Este estudio de 163 pacientes con IAMCEST asignados al azar a TRO40303 o placebo no encontró diferencias en el tamaño del infarto ya sea por liberación de biomarcador (endpoint primario) o CMR (153).

Varios otros ensayos han mostrado resultados negativos en el pasado.

EL FUTURO

Como en otras disciplinas, imaginamos que los avances en la próxima década se producirán al refinar las terapias ya disponibles en lugar de identificar nuevos fármacos. Para lograr este desafiante objetivo es imprescindible el compromiso de los organismos de financiación, las sociedades científicas y los socios industriales.

2.5 Receptores Beta 3 Adrenérgicos

Aunque es crucial para la respuesta fisiológica aguda al estrés, el sistema adrenérgico puede desadaptarse tras la estimulación prolongada en el curso del desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Esto ha sido la base para el desarrollo de terapias beta-bloqueantes,

dirigidas principalmente a los beta1-2 adrenoreceptores (B1-2AR).

Recientemente, el tercer isotipo de b-adrenoceptores (B3AR) ha cobrado importancia tras su identificación en los tejidos cardiovasculares humanos (154). Sus propiedades particulares y su ubicación en el corazón y los vasos, así como en otros tejidos (por ejemplo, grasa marrón) arrojan nueva luz sobre la regulación catecolaminérgica de la función y el remodelado de los tejidos cardiovasculares, con el potencial de poder encontrar nuevas modalidades terapéuticas.

2.5.1 Síntesis catecolaminérgica y circulación

Las catecolaminas secretadas en respuesta a la estimulación de la división simpática del sistema nervioso autónomo (SNS) tienen un gran impacto en la función cardíaca. En resumen, la síntesis de catecolaminas en las células cromafines de la médula suprarrenal está bajo el control del eje de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) - hormona adrenocorticotropa (ACTH) - cortisol y del SNS. Por lo tanto, el estrés detectado por el eje CRH-ACTH-cortisol desencadena la estimulación de la síntesis de norepinefrina, mientras la regulación al alza de la PNMT (feniletanolamina N-metil transferasa) permite la síntesis de epinefrina a partir de la norepinefrina. Las células cromafines secretan predominantemente epinefrina y en menor medida norepinefrina.

En el torrente sanguíneo, las catecolaminas tienen una vida media corta de pocos minutos y, por lo tanto, median una respuesta rápida al estrés externo asociándose con los adrenoceptores alfa y beta expresados en la membrana celular. En este sentido, la respuesta de lucha/huida representa una reacción fisiológica importante a la amenaza externa severa que induce la liberación centralizada de las

hormonas suprarrenales y la activación de los nervios simpáticos periféricos que conduce a un aumento de la frecuencia cardíaca, la contractilidad y a la movilización de las reservas de combustible de los músculos y la grasa. Debido a la rápida acción de las catecolaminas después de alcanzar sus tejidos diana, todas las respuestas se activan en cuestión de segundos con una breve acción biológica de aproximadamente 10 segundos. Es importante destacar que, a diferencia de otras hormonas, las hormonas suprarrenales no tienen un sistema de retroalimentación negativa basado en los niveles circulantes, pero su efecto es limitado en el tiempo debido a la recaptación de catecolaminas, la degradación y la desensibilización homóloga de los receptores adrenérgicos.

2.5.2 Catecolaminas en el fracaso cardíaco

Una serie de cambios complejos acaecidos en el sistema nervioso simpático cardíaco de los pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca conduce a un aumento pronunciado en la liberación de catecolaminas de los nervios simpáticos. Además, la activación de las glándulas suprarrenales eleva significativamente los niveles de catecolaminas circulantes (155).

Aunque la acción inicial de las catecolaminas es beneficiosa para la función del sistema cardiovascular, la activación intempestiva de los receptores adrenérgicos por niveles elevados de agonistas en el corazón debilitado causa tremendos efectos perjudiciales sobre la fisiología cardíaca. De hecho, los niveles circulantes de catecolaminas se correlacionan con el grado de disfunción cardíaca.

2.5.3 Señalización beta adrenérgica en el sistema cardiovascular

El SNS es un regulador clave de la función cardiovascular a través de los adrenorreceptores (AR). Las múltiples funciones de los AR surgen primero de la observación de que las catecolaminas pueden estimular tanto la vasodilatación como la vasoconstricción. En los tejidos cardíacos, se expresan AR tanto alfa como beta, aunque los beta-AR (BAR) son altamente predominantes. En condiciones fisiológicas, los BAR y sus vías de señalización regulan tanto la fuerza como la frecuencia de contracción y relajación miocárdica, mientras que los alfa adrenorreceptores (AAR) están implicados principalmente en el control del tono vascular debido a su alta densidad en la membrana plasmática de las células del músculo liso vascular. Entre los tres tipos de receptores beta-adrenérgicos implicados en los procesos cardiovasculares, los receptores adrenérgicos beta1 y beta2 (B1-2AR) son los más ampliamente estudiados, debido a su temprana identificación (156). Comparten un efecto inotrópico positivo común, pero también median la vasodilatación en vasos periféricos.

A pesar de pertenecer a los mismos subtipos de receptores, las vías de señalización de los dos receptores están lejos de ser equivalentes e incluyen diferencias importantes, altamente relacionadas con sus implicaciones en la fisiología cardíaca.

Tras la unión de la epinefrina al B1AR, la activación de G-alfa-s promueve el aumento de los niveles de AMP cíclico intracelular (cAMP) mediante la estimulación de la adenilil ciclasa. Contribuyen a mejorar la contractilidad cardíaca y reducen la duración de la contracción, como es el caso durante la respuesta de lucha/huida.

En cuanto a B2AR, que comprenden el 20-25% de los BARs, el receptor contribuye tanto a las respuestas cronotrópicas como inotrópicas en el corazón (157) a través de su capacidad para acoplarse a ambos G-alfa-s (aumenta el cAMP) y G-alfa-i (generando una señal antiapoptótica a los cardiomiocitos).

2.5.4 Receptores betaadrenérgicos en el corazón debilitado

En el corazón debilitado la sobreestimulación del sistema simpático daña células cardíacas a través de una activación sostenida de los B1-2AR. En los pacientes que sufren insuficiencia cardíaca, los BARs exhiben una menor sensibilidad a las catecolaminas, en su mayoría vinculados a una disminución de la densidad de los BARs en la membrana plasmática.

En cuanto al subtipo B1AR, este proceso incluye una reducción de la expresión del subtipo y de la abundancia de su mRNA hasta un 50%, en correlación con la diversidad de la enfermedad (158). Los B1AR restantes se desensibilizan a través de GRKs, cuya expresión se incrementa en el corazón humano debilitado. En conjunto, la pérdida de respuesta a las catecolaminas reduce los niveles de cAMP intracelular. Además, la fosfatasa-1, activada en el contexto de la insuficiencia cardíaca, afecta al estado de fosforilación del phospholamban. En su estado defosforilado el phospholamban inhibe la afinidad de SERCA 2A por el Ca^{2+} causando un daño miocárdico importante y contribuyendo significativamente a la disfunción miocárdica y remodelación del corazón debilitado (159).

Mientras que los niveles de expresión de B2AR permanecen sin cambios después de una lesión cardíaca, se observa un aumento de hasta dos veces de G-alfa-i en la insuficiencia cardíaca precoz. Estas observaciones son consistentes con una activación de la vía antiapoptótica de los B2AR en el corazón debilitado. Por lo tanto, el acoplamiento de los B2AR con G-alfa-i constituiría un intento de compensar y proteger el corazón contra los efectos perjudiciales causados por la sobreestimulación de los receptores beta-adrenérgicos que incluyen arritmias, desequilibrio energético, hipertrofia y apoptosis, mediante la activación de antiapoptosis y la inhibición de la

vía G-alfa-s. Alternativamente, el efecto beneficioso primario de los B2AR puede venir a costa comprometer la contractilidad miocárdica, ya que la vía altera la respuesta inotrópica beta-adrenérgica y puede impedir que el corazón satisfaga sus demandas, lo que conduce a un mayor deterioro de la insuficiencia cardíaca (160).

2.5.5 Receptores beta 3 adrenérgicos (B3ar)

Resumen

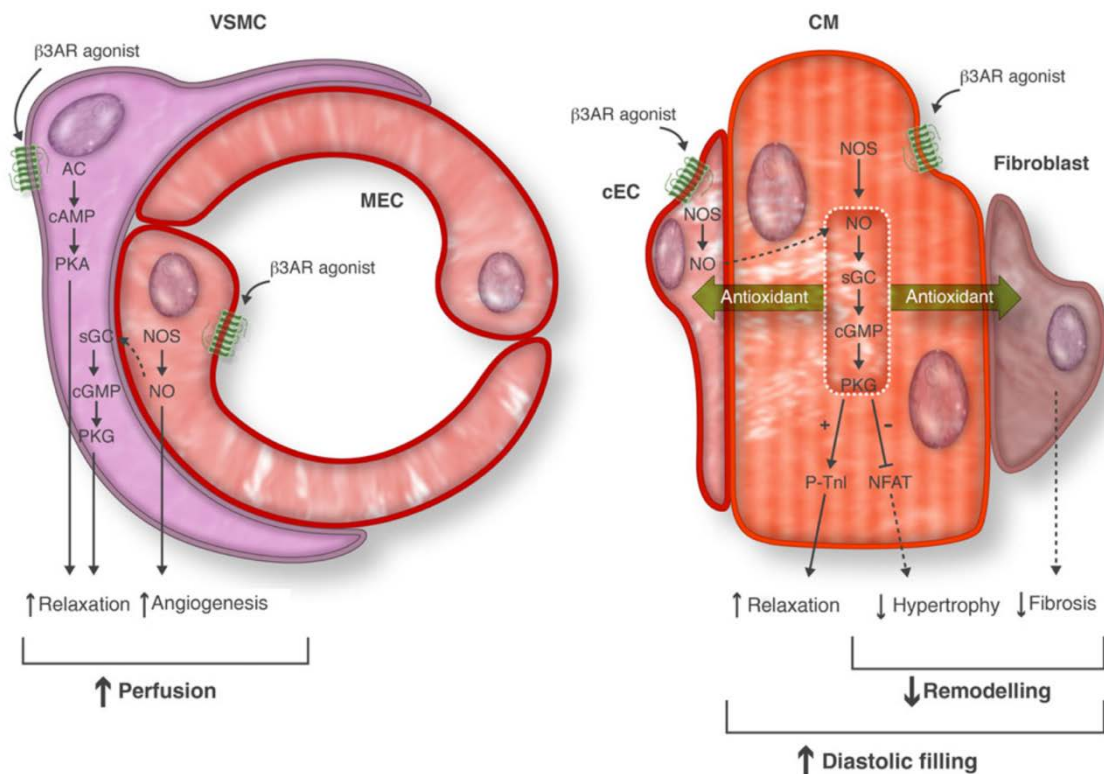
El cADN del B3AR se clonó en una biblioteca de cADN humano en 1989 (161). Se demostró que se expresaba en los adipocitos, donde mediaba la beta-oxidación adrenérgica de los ácidos grasos. Comparte la estructura de los GPCR típicos, con 40-50% de similitud de secuencia de aminoácidos con B1- y 2-AR, aunque con algunas diferencias clave (162). En particular, la mayoría de las diferencias se agrupan en el tercer bucle intracitoplásmico y en la cola C-terminal, donde el B3AR carece de las secuencias de consenso para la fosforilación por PKA y BARK (o GRK2 en los miocitos cardíacos). Este último es conocido por mediar el reclutamiento de la b-arrestina, con la posterior internalización del receptor que es responsable de su desensibilización homóloga. Como resultado, el B3AR es menos propenso (que B1 o B2-AR) a la pérdida progresiva de acoplamiento y eficacia en respuesta a la estimulación prolongada por catecolaminas.

La expresión de los B3AR en biopsias de corazones humanos se informó por primera vez en 1996 (154). Entonces, el desarrollo de un anticuerpo con especificidad validada para el B3AR humano permitió la inmunodetección de las proteínas en miocitos cardíacos auriculares y ventriculares humanos, así como en las células endoteliales de las microarterias coronarias. Con los mismos reactivos se demostró que la expresión de B3AR está aumentada en el tejido cardíaco humano de

pacientes con insuficiencia cardíaca, en los que se sabe que los B1-2 AR están disminuidos y desensibilizados (163), descubriendo un desequilibrio en la expresión de los tres isotipos en la enfermedad cardíaca. Además del corazón, los B3AR se expresan en células del músculo liso de la vejiga urinaria, donde median la relajación del músculo detrusor, mejorando así la capacidad de llenado de la vejiga. Esto ha justificado el desarrollo de agonistas B3AR específicos actualmente utilizados en la clínica para el tratamiento de la enfermedad de la vejiga hiperactiva (164).

B3AR: señalización y función en los tejidos cardiovasculares

Figura 1: Señalización y función de los B3



(Jean-Luc Balligand, CVR 2016) (165)

Señalización célula dependiente de los B3AR. Los agonistas B3AR (o catecolaminas endógenas) activan B3AR en los miocitos cardíacos (CM), células endoteliales microvasculares cardíacas (capilares) (cEC), células endoteliales macrovasculares (MEC) y células de músculo liso vascular (VSMC) de las arterias coronarias. En CM y ECs, los B3AR activan la NOS y la secuencia de guanilil ciclasa (sGC) / GMP cíclico cGMP / proteína quinasa G (PKG) que producen relajación autocrina (CM) o paracrina (ECs) del músculo cardíaco y vascular respectivamente. En algunos lechos vasculares, los B3AR también se unen a Adenyl Cyclase (AC) / AMP cíclico (cAMP) / proteína quinasa A (PKA) para producir directamente relajación vascular. Además de los efectos pro-angiogénicos inducidos por NO en células endoteliales, estos efectos vasorelajantes contribuyen a mejorar la perfusión miocárdica. En CM, los B3AR disminuyen la hipertrofia que, junto con los efectos antioxidantes en CM y células vecinas como los fibroblastos (fib), previene el remodelado hipertrófico y fibrótico, preservando así el relleno diastólico.

El acoplamiento de los B3AR a efectores de la señalización intracelular varía entre tejidos y tipos de células. En el lecho vascular, la expresión de los B3AR varía entre los diferentes lechos vasculares y los vasos de

diferentes tamaños. Los B3AR se pueden expresar tanto en células de músculo liso y células endoteliales o sólo en endotelio según los lechos vasculares. Aunque la activación de los B3AR generalmente produce *relajación vascular*, el acoplamiento de los B3AR a los efectores intracelulares también varía de acuerdo con el tipo de célula.

En las microarterias coronarias, la relajación inducida por los B3AR está mediada por las respuestas dependientes tanto de NO como de EDHF (166). Aunque la identidad definitiva de EDHF no está aun clara, un mediador propuesto es el K^+ extracelular que impulsaría la hiperpolarización a través de la activación de Na^+ ATPasa. Esto es interesante a la vista de la demostración reciente de que B3AR protege la subunidad beta1 de Na/K ATPasa de la inactivación por la S-glutathionilación oxidativa, manteniendo de este modo la actividad de la bomba frente al estrés oxidante, como ocurre, por ejemplo, en la diabetes (167).

Esto estaría en consonancia con los *efectos antioxidantes* de B3AR, como también se observó en un contexto de isquemia aguda (168). Tales propiedades contribuirían a mantener las respuestas vasodilatadoras de NO y EDHF en la enfermedad. Además, los efectos antioxidantes de la señalización B3AR pueden preservar el endotelio del lecho microvascular de la activación oxidativa y el consiguiente reclutamiento de monocitos iniciando la inflamación subendotelial en el núcleo de la disfunción endotelial sostenida. Si esto evitará o no el desarrollo crónico de la aterosclerosis vascular o el desarrollo crónico de la disfunción diastólica que inicia la Insuficiencia Cardíaca con fracción de eyección preservada tendrá que ser probado con intervenciones a largo plazo.

La *señalización paracrina* modulada por los B3AR de los miocitos a las células circundantes (por ejemplo, fibroblastos) y recíprocamente, de las células endoteliales a los miocitos vasculares y cardíacos da como

resultado una reducción de la fibrosis intersticial, una neoangiogénesis incrementada y una vasodilatación coronaria.

Los B3AR también se expresan en el lecho arterial pulmonar de algunas especies (169), lo que contribuiría a atenuar la *vasoconstricción pulmonar* y reducir la hipertensión pulmonar precapilar.

A nivel celular, aunque los B3AR se expresan en los miocitos cardíacos humanos, la expresión del receptor varía de especie a especie, con baja expresión en ratones, pero mayor en ratas, conejos o perros. Es importante recordar que la expresión aumenta con la enfermedad (163). En las biopsias ventriculares humanas, la producción de NO inducida por B3AR es sensible a la toxina pertussis, lo que sugiere el acoplamiento de los B3AR a las proteínas G-alfa-i y a la producción de cGMP dependiente de NOS (170). Si los B3AR pueden acoplarse a G-alfa-s (y Adenylyl Cyclase / cAMP) además de G-alfa-i (como hacen los B2AR en algunas condiciones) sigue sin resolverse.

Distalmente al cGMP encontramos que los B3AR activan la señalización dependiente de PKG que resulta en la *inhibición de la hipertrofia miocárdica* (171). También activan la fosforilación de titina o troponina I dando como resultado una disminución de la sensibilidad al calcio de los myofilamentos y una *relajación diastólica mejorada que promovería el llenado de ventrículo izquierdo* (172), cosa que se podría conseguir también de forma paracrina por liberación de NO desde el endotelio.

Respecto a la *fuerza contráctil* varios grupos examinaron el efecto de los agonistas B3 in vivo en animales grandes sanos o modelos de insuficiencia cardíaca, con resultados algo divergentes. Aunque algunos concluyen que hay un efecto inotrópico negativo (principalmente en los modelos de IC) (173,174), otros no (175,176).

Un estudio concluyó que existe un pequeño efecto inotrópico negativo en ovejas sanas, pero una mejora de parámetros inotrópicos en ovejas

con insuficiencia cardíaca (176). Esto se atribuyó a la preservación de la función de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en los cardiomiocitos debilitados que fallan, que podría reducir el contenido intracelular de Na^+ . Interesantemente, reducciones del contenido de Na^+ y la corriente tardía de Na^+ se propusieron como mecanismo de mejora de la relajación miocárdica, lo que sería particularmente útil en la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada (177).

Por todo esto se podría decir que una característica distintiva de B3AR es oponerse al efecto inotrópico positivo clásico de B1-2AR, actuando así como un *"freno" de contrapeso* para prevenir la sobreactivación adrenérgica (154).

En los últimos tiempos está ganando atención renovada la grasa beige /marrón. De hecho, aunque el papel de la grasa marrón en la termogénesis y el gasto energético está claramente establecido en los modelos de roedores, la identificación inequívoca de la grasa marrón residual en humanos adultos sólo se adujo recientemente (178). La grasa marrón puede regular de manera significativa el gasto energético. Los B3AR se expresan en adipocitos beige / marrón humanos y median la b-oxidación adrenérgica de los ácidos grasos. Por lo tanto, la administración sistémica de agonistas B3AR puede conferir protección cardiovascular adicional mejorando el estado metabólico.

Además de estas propiedades cardioprotectoras, los primeros trabajos habían implicado el acoplamiento de los B3AR a eNOS y nNOS en los efectos beneficiosos del *ejercicio* sobre el corazón (179), así como en la protección miocárdica en el contexto de *isquemia / reperfusión* (I/R) en ratones (180). Este último se reprodujo recientemente en un modelo de animal grande (porcino), en el que la pre-perfusión del agonista B3, BRL37344 redujo el daño por reperfusión y mejoró la función a largo plazo del VI (181). Aquí se apuntó a la prevención mediada por Akt / NO de la apertura del poro de transición de

permeabilidad mitocondrial (mPTP) como un mecanismo subyacente. Como ya se ha comentado anteriormente el destino de los cardiomiocitos en la lesión por I/R depende en gran medida de las mitocondrias. La apertura irreversible y patológica del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en el inicio de la reperfusión está bien establecida como un determinante importante de la muerte de cardiomiocitos. Un regulador clave de la apertura mPTP es la ciclofosilina-D mitocondrial (CypD) y su inhibición farmacológica con ciclosporina-A (CsA) reduce, según se ha demostrado, el tamaño del infarto, tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (40,132). En el estudio antes mencionado de García Prieto et al (181), la incubación con agonista b3 (BRL37344, 7 micromol / l) redujo significativamente la muerte celular en cardiomiocitos aislados de ratón adultos durante la hipoxia / reoxigenación; asimismo también redujo la susceptibilidad a la apertura perjudicial del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) a través de un mecanismo dependiente del Akt-NO como vía de señalización. La administración de BRL37344 previa a la reperfusión no tuvo efecto sobre el tamaño del infarto en ratones KO de ciclofilina-D, lo que sigue implicando al mPTP en el mecanismo de protección.

2.5.6 Nuestro trabajo

Se necesitan agonistas B3 altamente específicos para probar clínicamente el efecto beneficioso de la activación de los receptores B3-adrenérgicos. Además del corazón, los B3AR se expresan en células de músculo liso de la vejiga urinaria, donde median la relajación del músculo detrusor, mejorando así la capacidad de llenado de la vejiga. Recientemente, se ha desarrollado y aprobado un nuevo agonista específico de los B3AR humano, el mirabegron, en Europa, Estados Unidos y Japón para el tratamiento de la enfermedad de la vejiga

hiperactiva. Esta condición urológica se caracteriza por una micción frecuente y aquí se ha demostrado que el fármaco mejora el llenado de la vejiga a través de sus propiedades miorrelajantes mediada por la activación de los B3AR en el músculo detrusor (164). Este fármaco tiene una especificidad superior (para B3AR en comparación con β 1-2AR) comparado con otros agonistas, con una biodisponibilidad bien documentada y poco potencial de generar efectos adversos resultantes de las interacciones medicamentosas. El mirabegron es metabolizado por CYP3A4 y es un (débil) inhibidor de CYP2D6 y P-GP; También se elimina por excreción urinaria. Además, los datos clínicos de los estudios clínicos de mirabegron en la enfermedad de vejiga hiperactiva señalaron que no había complicaciones cardiovasculares en las poblaciones de ensayos clínicos. Tras el tratamiento con mirabegron, se observó un aumento de aproximadamente 1 lpm en la frecuencia cardíaca y un aumento de la presión arterial sistólica <1 mmHg que no se asoció con un aumento de las complicaciones cardiovasculares (Agencia Europea de Medicamentos mirabegron EPAR informe EMA / 706651/2012).

El desarrollo de este agonista específico (mirabegron) junto con la evidencia preclínica de la estimulación B3 descrita anteriormente ha sido nuestro incentivo para realizar el estudio actual. Como ya comentamos anteriormente, los ensayos clínicos piloto en humanos sólo se justifican cuando se encuentran beneficios sólidos e indiscutibles en los modelos de animales grandes.

Nuestro objetivo es analizar el efecto de la infusión de la pre-reperfusión de mirabegron sobre el tamaño del infarto, remodelado ventricular y cardíaca de la función en un modelo de IRI.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El Mirabegron, un B3 Agonista que ya está disponible en el mercado farmacéutico, tiene efecto cardioprotector administrado en el seno de un modelo de isquemia/reperfusión en animal grande (porcino)

OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto del agonismo selectivo beta-3 adrenérgico como cardioprotector (disminución del tamaño del infarto) en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio evaluado mediante resonancia magnética.
2. Evaluar el efecto del agonismo selectivo beta-3 adrenérgico como agente beneficioso (mejora del remodelado ventricular y función ventricular) a largo plazo en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio evaluado mediante resonancia magnética.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Fase 1: Estudio de dosis/respuesta

Dada la ausencia de antecedentes en la utilización de los fármacos beta-3 agonistas en animal grande, se hace necesario un ensayo piloto cuyo objetivo es la búsqueda de la dosis óptima a administrar para cumplir los objetivos anteriormente enumerados.

4.1.1 Descripción del procedimiento

En este trabajo se utilizarán cerdos machos castrados de raza *Large-White*, procedentes de la granja del CNIC.

Los cerdos llegarán al CNIC al menos una semana antes de realizar el protocolo, donde entraron en el programa de socialización dirigido por el equipo veterinario del animalario.

Aproximadamente una semana tras su llegada, cuando su peso esté entre los 30 y 35 Kg, se procederá a anestésarlos mediante inyección intramuscular (IM) de ketamina (15 mg/Kg) y Xylazina (1 mg/Kg) dentro de su propia jaula. Una vez anestesiados, serán llevados a sala de preparación donde se les canulará ambas venas marginales de la oreja con catéter de 20-22G de diámetro. Posteriormente se procederá a la intubación orotraqueal (IOT), que se conectará a un respirador portátil. Los animales serán ventilados con unos parámetros predeterminados (PSV 8, PEEP 1, FiO₂ 0,28, volumen ajustado a 30-35 kg, min RR 16 / min). Se rasurará la región inguinal y torácica. El animal será transportado entonces a la sala de hemodinámica, donde se posicionará en la mesa radiotransparente sobre soporte en cuña para mantenerlo en decúbito supino. La anestesia se mantendrá con infusión continua de midazolam, ketamina y xylazina (no utilizamos gases anestésicos inhalados por ser cardioprotectores).

Se procederá a canular mediante la técnica de *Seldinger* (acceso por punción percutánea) las 2 arterias femorales y a insertar introductores de 5 y 6 french de diámetro. Además se canalizará por la misma técnica una vena femoral para insertar un introductor de 8 french.

Bajo guía fluoroscópica, se insertará un catéter de Swan-Ganz en la arteria pulmonar a través de un acceso venoso femoral. Se conectará el catéter a la consola para realizar registro continuo de las presiones de la arteria pulmonar y de enclavamiento pulmonar. Asimismo, se insertará un catéter pigtail en ventrículo izquierdo (VI) a través de vía arterial femoral para monitorización de la presión telediastólica del VI.

Se procederá posteriormente a la administración de Mirabegron al 95% de pureza. Se utilizarán dosis crecientes (5, 10, 50, 500 microgramos/Kg; estas dosis han sido seleccionadas arbitrariamente en base a experimentos previos que ha realizado el grupo (resultados no publicados)) junto con 100 microlitros de DSMO (+20 cc de solución salina) como vehículo para cada dosis y se administrarán por vía intravenosa (vía venosa del oído) en 1 minuto bajo estrecha monitorización hemodinámica con el objetivo de buscar la máxima dosis de fármaco que no provoque deterioro hemodinámico, siendo esta dosis la que se administrará en el protocolo de infarto (ver posteriormente). Se realizarán anotaciones de los parámetros hemodinámicos medidos (presión arterial sistémica, frecuencia cardiaca, presión arterial pulmonar, presión capilar pulmonar) cada minuto a partir de la administración del fármaco, siendo el gasto cardiaco medido por técnica de termodilución cada 5 minutos, hasta completar 20 minutos tras la administración de la dosis correspondiente. Además, se dejarán 30 minutos de lavado adicionales hasta la administración de la siguiente dosis.

Tras finalizar el protocolo, se suspenderá la infusión de midazolam tras realizar hemostasia vascular. El cerdo será transportado a la zona de

recuperación y se extubará cuando tenga reflejo masticatorio positivo y mantenga una respiración espontánea regular. Si fuese necesario un despertar acelerado se administraría una dosis de anexate (flumazenilo) iv. Las vías se retirarán una vez despertado al animal.

4.1.2 Efectos adversos y criterios de punto final

El agonista b3-adrenérgico utilizado es un compuesto aprobado para su uso humano con otra indicación distinta a aspectos cardiovasculares, por lo que más allá de efectos conocidos del fármaco (taquicardia transitoria no significativa) no son esperables complicaciones graves derivadas de su uso.

Además, pueden aparecer complicaciones locales a nivel vascular (hematoma post-procedimiento, cojera), que se tratarán de manera conservadora utilizando analgésicos que no sean del grupo AINE, como por ejemplo la buprenorfina.

4.1.3 Diseño experimental

a. Hipótesis estadística que se quiere testar en el experimento.

Se trata de un ensayo piloto cuyo objetivo es la búsqueda de la dosis máxima de agonista b3 selectivo que es capaz de tolerar el animal sin provocar deterioro hemodinámico.

b. Variable respuesta que se va a utilizar en el cálculo del tamaño muestral.

Las variables respuesta utilizadas serán parámetros hemodinámicos: presión arterial sistémica, frecuencia cardiaca, presión arterial pulmonar y gasto cardiaco.

c. Grupos experimentales que se van a comparar.

Las medias de las variables respuesta serán comparadas respecto a las mediciones basales mediante un t-test bilateral en cada momento de medición y para cada dosis.

d. Tamaño del efecto

Se considerará como respuesta hemodinámicamente importante una variación del 10% respecto a las mediciones obtenidas basalmente.

e. Número de animales totales utilizados

Se estima arbitrariamente un tamaño muestral de 6 animales

Gráfica de toma de datos

Ear tag:

Weight:

Date:

Dose:

Rack:

	RR	Sat	HR	SAP	PAP	PCP	CO_1	CO_2	CO_3	CO_mean
Baseline										
1										
2										
3										
4										
Min 5										
6										
7										
8										
9										
Min 10										
11										
12										
13										
14										
Min 15										
16										
17										
18										
19										
Min 20										

RR (respiratory rate) in times/min; Sat (oxygen saturation) in %; HR (heart rate) in beats/min; SAP (systemic arterial pressure) in mmHg; PAP (pulmonary arterial pressure) in mmHg; PCP (pulmonary capillary pressure) in mmHg; CO (cardiac output) in l/min.

Observations:

4.2 Fase 2: Estudio de los efectos cardioprotectores de la administración pre-reperfusión de mirabegron en el modelo porcino de Infarto de Miocardio.

4.2.1 Descripción del procedimiento

En este trabajo se utilizarán cerdos machos castrados de raza *Large-White*, procedentes de la granja del CNIC. El protocolo de inducción de IAM ha sido reportado por nuestro grupo previamente (134,135), a continuación detallamos los pasos.

Los cerdos llegarán al CNIC al menos una semana antes de realizar el protocolo, donde entrarán en el programa de socialización dirigido por el equipo veterinario del animalario.

Aproximadamente una semana tras su llegada, cuando su peso esté entre los 30 y 35 Kg, se procederá a anestesiarnos mediante inyección intramuscular (IM) de ketamina (15 mg/Kg) y Xylazina (1 mg/Kg) dentro de su propia jaula. Una vez anestesiados serán llevados a la sala de preparación donde se les canulará ambas venas marginales de la oreja con catéter de 20-22G de diámetro. Posteriormente se procederá a la intubación orotraqueal (IOT), que se conectará a un respirador portátil. Los animales serán ventilados con unos parámetros predeterminados (PSV 8, PEEP 1, FiO₂ 0,28, volumen ajustado a 30-35 kg, min RR 16 / min). Se rasurará la región inguinal y torácica. El animal será transportado entonces a la sala de hemodinámica, donde se posicionará en la mesa radiotransparente sobre soporte en cuña para mantenerlo en decúbito supino. La anestesia se mantendrá con infusión continua de midazolam, ketamina y xylazina (no utilizamos gases anestésicos inhalados por ser cardioprotectores). Dado que el modelo porcino de IAM tiene una tasa muy elevada de arritmias ventriculares malignas (paradas cardíacas por arritmias), realizaremos una infusión continua del fármaco antiarrítmico amiodarona (300 mg

en 50cc de suero glucosado 5%), que se iniciará en el momento de la oclusión coronaria.

Se procederá a canular mediante la técnica *Seldinger* (acceso por punción percutánea) las 2 arterias femorales y a insertar introductores de 5 y 6 french de diámetro. Además, se canalizará por la misma técnica una vena femoral para insertar un introductor de 5 french.

Una vez realizados los accesos vasculares, se procederá a heparinizar al animal por vía i.v (300 IU/Kg de heparina sódica).

Bajo guía fluoroscópica, se insertará un catéter de Swan-Ganz en la arteria pulmonar a través del acceso venoso femoral. Se conectará el catéter a la consola para registro continuo de las presiones de arteria pulmonar y de enclavamiento pulmonar. Asimismo, se insertará un catéter pigtail en ventrículo izquierdo (VI) a través de vía arterial femoral para monitorización de la presión telediastólica del VI.

Se progresará un catéter guía coronario a través de la guía vascular hasta canular el tronco coronario izquierdo. Se progresará la guía coronaria hasta la porción distal de la arteria descendente anterior, y a través de ésta, se avanzará el balón de angioplastia coronaria, que se hinchará inmediatamente después de la salida de la primera rama diagonal, ocluyendo el flujo coronario distal al balón. Se mantendrá inflado el balón durante 45 minutos pasados los cuales se deshinchará. Se administrará nitroglicerina intracoronaria (0.1 mg), y se retirará todo el material. Se realizará hemostasia de las punciones arteriales y venosas mediante compresión manual.

En los casos de fibrilación ventricular, se procederá a desfibrilar (tantas veces como fuera necesario).

Los grupos experimentales del estudio serán 2:

- **Grupo 1:** recibieron en el minuto 40 de isquemia la dosis de **b3**

agonista establecida como óptima en el ensayo piloto, por vía intravenosa.

- **Grupo 2:** recibirá **placebo** en el minuto 40 de isquemia

Se suspenderá la infusión de anestésicos tras realizar hemostasia vascular. El cerdo será transportado a la zona de recuperación, y se extubará cuando tenga reflejo masticatorio positivo y mantenga respiración espontánea regular. Si fuese necesario un despertar acelerado, se administraría una dosis de anexate (flumazenilo) iv. Las vías se retirarán una vez despertado al animal.

A los animales se les realizará una resonancia magnética cardiaca en los días 5-7 post-IAM. Posteriormente los animales serán enviados de vuelta a la granja, donde estarán hasta el día 45 post-IAM aproximadamente, cuando regresarán al CNIC para hacerse una nueva resonancia magnética cardiaca y posterior sacrificio.

Todos los animales recibirán clopidogrel 75mg/24h durante 3 días v.o. (además de una primera dosis el mismo día del procedimiento, previo al mismo, de 150 mg) para evitar una trombosis coronaria post procedimiento.

4.2.2 Efectos Adversos y Criterios de Punto Final

El objetivo del protocolo es inducir un IAM extenso, por lo que son asumibles las siguientes complicaciones.

- Fibrilación ventricular/Taquicardia ventricular durante el procedimiento: Para minimizar esta complicación se administra la infusión de amiodarona y pese a esto la incidencia es del 50-75%. En caso de ocurrir, se procederá a desfibrilación externa.

- Fibrilación ventricular/Taquicardia ventricular en las primeras 24h: Existe la posibilidad de una arritmia maligna en las 24-48h post-IAM. En ese caso, se trataría de una muerte súbita donde nos encontraremos al animal muerto. Esos casos no se pueden prevenir y en cualquier caso se producen sin ningún tipo de sufrimiento del animal.
- Insuficiencia cardíaca aguda: En algunos casos, debido al gran deterioro de la función contráctil del corazón, el animal puede presentar signos de edema de pulmón (taquipnea, imposibilidad de decúbito, intranquilidad, desaturación de oxígeno). En esos casos, se administrará una dosis de diurético intravenoso (20 mg de furosemida iv). Si pese a ello se mantienen los síntomas, se procederá al sacrificio del animal.
- En los 5 días posteriores a la realización del infarto de miocardio (especialmente durante los 3 primeros días) pueden aparecer como efectos esperables cierto grado de inactividad y anorexia consecuencia de la disminución de la función del ventrículo izquierdo.
- El resto de complicaciones podrán ser a nivel vascular (hematoma post-procedimiento, cojera), que se tratarán de manera conservadora utilizando analgésicos que no sean del grupo AINE, como por ejemplo la buprenorfina.
- No es previsible la aparición de efectos adversos significativos por la administración del fármaco a largo plazo.

4.2.3 Destino final de los animales

El sacrificio (tanto precoz por insuficiencia cardíaca como el programado al finalizar el experimento) se realizará con infusión intravenosa de barbitúricos a dosis alta bajo sedación previa con

ketamina+xylazina.

El animal es anestesiado y se canulará un acceso venoso. Se lleva al animal a la sala de necropsias y se realiza la infusión de barbitúricos a dosis alta por vía endovenosa. Inmediatamente tras la administración (que tiene efecto inmediato) se procede a apertura del tórax y extracción de corazón para ulterior procesado.

4.2.4 Fármaco (mirabegron)

El mirabegron es un fármaco ya comercializado, pero su forma de administración es vía oral. Para que este estudio sea traslacional necesitamos dar el fármaco vía i.v. momentos antes de la reperusión. Para conseguir esta formulación hemos comprado el fármaco en polvos y lo hemos preparado para su administración i.v.

4.2.5 Diseño experimental

a. Hipótesis estadística que se quiere testar en el experimento.

- El tratamiento con agonista selectivo beta-3 adrenérgico previo a la reperusión disminuye el tamaño del infarto medido por resonancia magnética a día 5-7 postinfarto en un modelo de isquemia-reperusión porcino.

- El tratamiento con agonista selectivo beta-3 adrenérgico previo a la reperusión mejora el remodelado ventricular a largo plazo, evaluado por volúmenes y fracción de eyección ventricular izquierda a día 45 postinfarto.

b. Variable respuesta que se va a utilizar en el cálculo del tamaño muestral.

Grupo a estudio, fracción de eyección, volumen telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo, % de necrosis y edema del ventrículo izquierdo.

c. Análisis estadístico de los grupos experimentales que se van a comparar.

La distribución normal de cada conjunto de datos se verificará mediante métodos gráficos y una prueba de Shapiro-Wilk. Si se distribuyen normalmente, las variables continuas se expresarán como media \pm desviación estándar. La prueba robusta de Levene se realizará para verificar la igualdad de varianzas entre grupos. Todas las comparaciones se explorarán, ajustando los valores de la p para las comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni. Se considerará estadísticamente significativo un valor de P inferior a 0,05. Se utilizará el software STATA, versión 13.1 (Stata Corp, College Station, TX, EE.UU.).

d. Tamaño del efecto (Ratio entre la diferencia mínima (biológicamente relevante) en la variable respuesta que se quiere detectar entre los grupos experimentales y la desviación estándar de la población)

Diferencia mínima a detectar en tamaño del infarto: 7%

Diferencia mínima a detectar en fracción de eyección y volúmenes ventriculares: 4 y 12%, respectivamente.

Desviación estándar: 8

e. Potencia y nivel de significancia.

Potencia: 90%

Nivel de significación bilateral: 0,05

f. Número de animales totales para análisis estadístico a término del estudio.

Se estima un tamaño muestral necesario de 20 animales vivos a final de seguimiento para alcanzar los objetivos deseados, lo que implica

(asumiendo la mortalidad descrita abajo) una muestra necesaria a inicio del estudio de 26 animales. Los animales serán distribuidos entre los 2 grupos de forma homogénea y aleatoria, resultando un tamaño de muestra inicial de 13 animales/grupo.

g. Porcentaje de pérdidas esperadas en el transcurso del experimento y número de animales totales al inicio del estudio.

La mortalidad en nuestro grupo en el modelo de isquemia-reperfusión percutáneo en cerdo es del 20%, a lo que habría que sumar un 10% de bajas esperadas en el seguimiento tras la realización del infarto de miocardio. Ello hace una mortalidad esperada final del 30%.

4.2.6 Resonancia Magnética Cardíaca

Se realizará un completo estudio de resonancia magnética cardiaca, con secuencias específicas para evaluar la función cardiaca, el edema miocárdico, la perfusión miocárdica y la necrosis/fibrosis miocárdica. La mayoría de los estudios se realizarán en un imán de 3.0 Teslas (Achieva Tx, Philips Medical Systems) con método de disparo vectorcardiográfico y una antena de superficie phased-array de 32 canales.

Todas las secuencias serán adquiridas en modo de apnea durante la espiración. Tras la adquisición de los localizadores anatómicos estándar, se prescribirán una serie de cortes en el eje corto para cubrir todo el ventrículo izquierdo. Se realizarán las siguientes secuencias: Steady State Free Process para la estructura y función cardiaca, Triple Inversión-Recuperación Turbo Spin Eco potenciada en T2 para la valoración del edema miocárdico (y posterior cálculo de área en riesgo), Eco de Gradiente Saturación Recuperación "Fast Low Flip Angle" para la valoración de la perfusión miocárdica, Eco de gradiente Inversión Recuperación "Fast Low Flip Angle" para el realce tardío

(valoración de la necrosis/fibrosis miocárdica/obstrucción microvascular). La duración total del estudio será de 45 a 60 minutos.

a. Descripción del procedimiento

El día 5-7 post-infarto se procederá a anestesiarse nuevamente a los cerdos de igual manera en su box. Se llevarán de nuevo a la sala de preparación, y se procederá de nuevo a su intubación orotraqueal y canulación en una vena marginal de la oreja. Se conectará el tubo traqueal a un respirador portátil compatible con resonancia magnética, y se mantendrá la anestesia con perfusión de midazolam (0.2 mg/kg/h).

Se requiere una anestesia profunda porque las secuencias de resonancia magnética requieren una pausa de apnea de unos 10-15 segundos, que sólo puede conseguirse en animales con una supresión de la respiración espontánea y mantenimiento con ventilador (en ese caso se puede apagar el ventilador 10-15 segundos y asegurarse de la apnea controlada).

Se llevará al animal a la resonancia magnética de 3T, y se colocará en posición supina, con el respirador conectado y la perfusión continua de midazolam. El estudio de resonancia magnética dura aproximadamente 60 minutos.

Una vez finalizado el estudio, se suspenderá la perfusión de midazolam y se llevará al animal a la zona de recuperación. Se extubará al animal de igual manera que tras el IAM. Si la sedación es muy profunda, se puede administrar una dosis de flumazenilo (antagonista de benzodiacepinas) consiguiendo un despertar inmediato.

El procedimiento arriba descrito se repetirá para la realización de la resonancia cardiaca en el día 45 post-IAM.

b. Efectos Adversos y Criterios de Punto Final

Es excepcional tener un efecto adverso durante la resonancia magnética cardíaca. Hipotéticamente podría producirse hipoxemia o hipercapnia por las apneas necesarias, o hipotensión por depresión de la contractilidad miocárdica secundaria a la administración de benzodiacepinas. En estos casos se procedería al aumento del flujo inspiratorio de oxígeno y mayor espaciamiento de las apneas o reducción del ritmo de infusión de midazolam. En casos aislados podría ocurrir reacción alérgica al contraste, aunque los cambios descritos son reacciones leves sin complicaciones mayores.

c. Adquisición de secuencias:

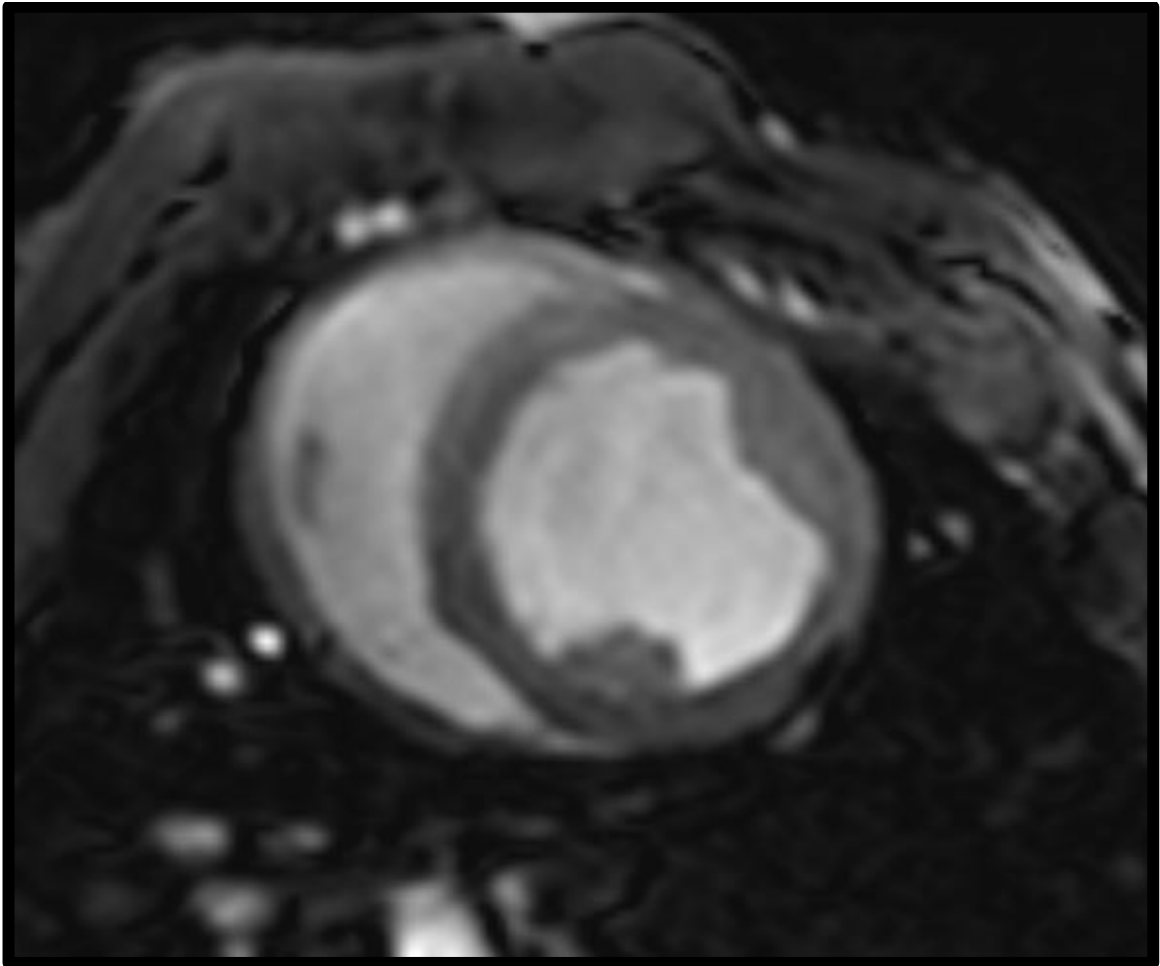
Estructura y función ventricular izquierda:

Secuencia: Steady State Free Process (SSFP). En espiración.

- Adquisición en el eje largo: Número de cortes: 1. Planos: 4 cámaras: Pasando por el ápex y el centro de las válvulas mitral y tricúspide. 2 cámaras: Pasando por el ápex y el centro de la válvula mitral. 3 cámaras: Pasando por el ápex y el centro de la válvula mitral y el tracto de salida de VI. Adquisición en el eje corto: Número de cortes: 13. De base a ápex; el corte más basal a nivel de la unión AV en telediástole (calculado desde el eje largo previo).

- Parámetros secuencia: Número de cortes (eje corto): 13. TR/TE: 2.8/1.4 (el más corto). Medias: 1. Flip angle: 45. FOV: 280 x 280. Grosor: 8 mm sin GAP. Resolución espacial máxima: 1.8 mm x 1,8 mm. Resolución temporal <45ms (Fases reconstrucción: 25). NEX: 3. Usar imagen paralela: GRAPPA o SENSE con factor 1.5-2. Ancho de

banda: 930 Hz/Pixel (máximo). Líneas por segmento: 11 (dependiendo de frecuencia cardíaca). Trigger: ECG retro.



Edema miocárdico:

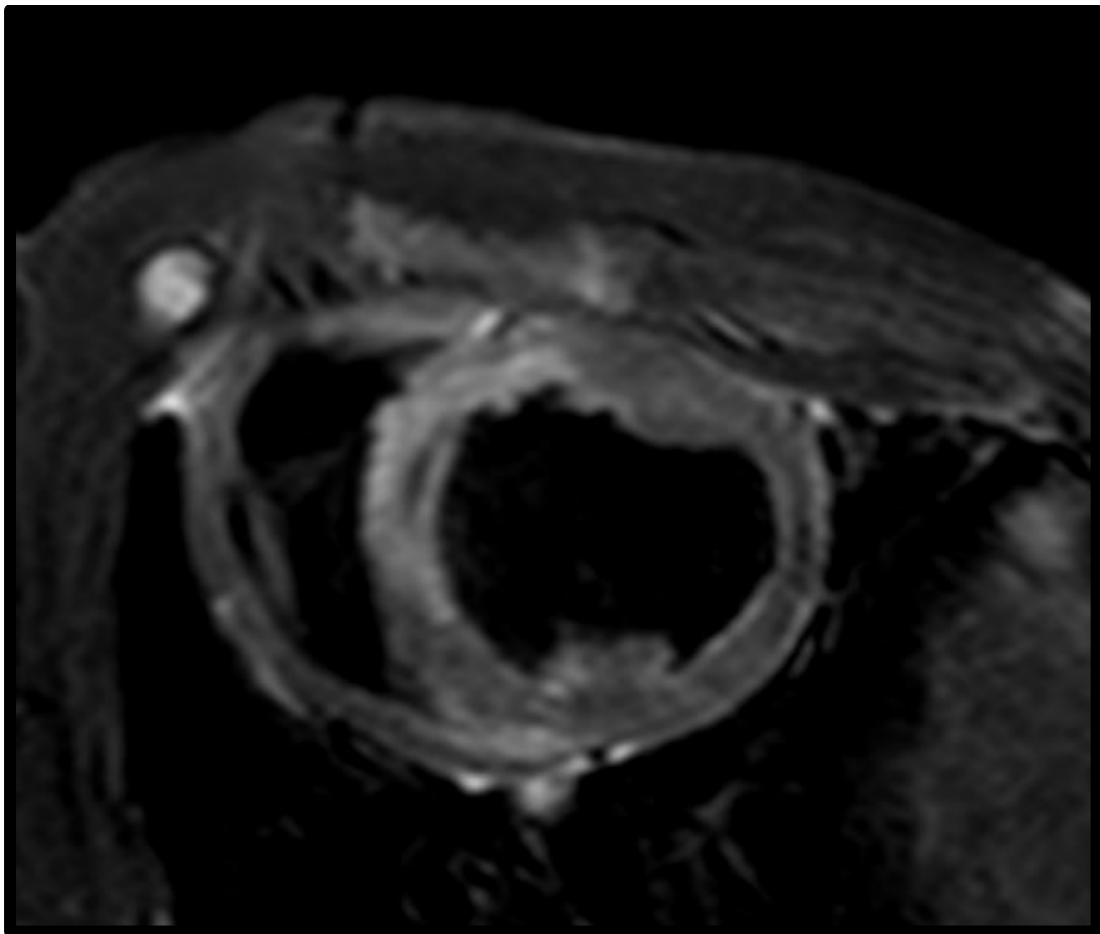
Secuencia: Triple Inversión-Recuperación Turbo Spin Eco (STIR) potenciada en T2. En espiración.

- Adquisición en el eje largo y eje corto: Los mismos planos y cortes que para la función (sólo 4 y 2 cámaras en eje largo).

- Parámetros secuencia: Número de cortes (eje corto): 13. TR/TE: 2-3 RRs/80 ms. STIR delay 210 ms. Flip angle: 180°. Matriz: 256 x 256. FOV: 280 x 280 mm. Grosor: 8 mm sin GAP. Resolución espacial máxima: 1.4 x 1.4. Turbofactor: 13-17-28. Echo-train length 16.

Ancho de banda (ajustable a cada equipo): 62.5 - 349 Hz/Pixel.

Trigger: ECG. Retraso trigger: longest (adquisición justo antes de la R). Se utiliza un algoritmo de corrección durante la adquisición para todas las imágenes T2W.



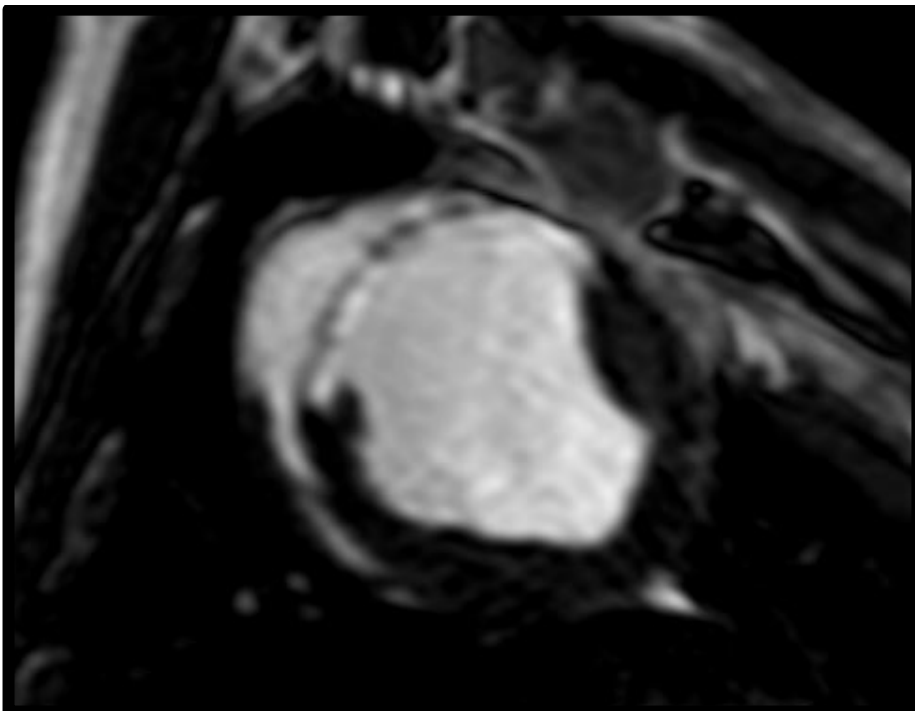
Realce tardío:

Utilizada para la valoración de la necrosis/fibrosis miocárdica y obstrucción microvascular.

Eco de gradiente Inversión Recuperación “Fast Low Flip Angle”. En espiración.

- Adquisición en el eje largo y eje corto: Los mismos planos y cortes que para la función y el edema. Sólo 4 y 2 cámaras en eje largo (para corroborar los hallazgos del eje corto).

- Parámetros secuencia: Número de cortes: 13 (los mismos cortes axiales que para la función y el edema). Grosor de corte: 8 mm sin Gap. Resolución espacial máxima: 1.6 x 1.6. TR/TE: 5.6 ms/2.8. TI: variable, en torno a 200 a 350 ms. Flip angle: 25°. Número de segmentos: 20-25. Medias: 1. FOV: 280 x 280. Ancho de banda: 304 Hz/Pixel. 2 NEX. Trigger: ECG. Retraso trigger: lo más prolongado. Pulso de trigger: 1-2-3. - Tiempo tras infusión del contraste: 15 minutos – Cantidad de contraste: 0.2 mmol/kg gadopentate dimeglumine



d. Análisis de las imágenes:

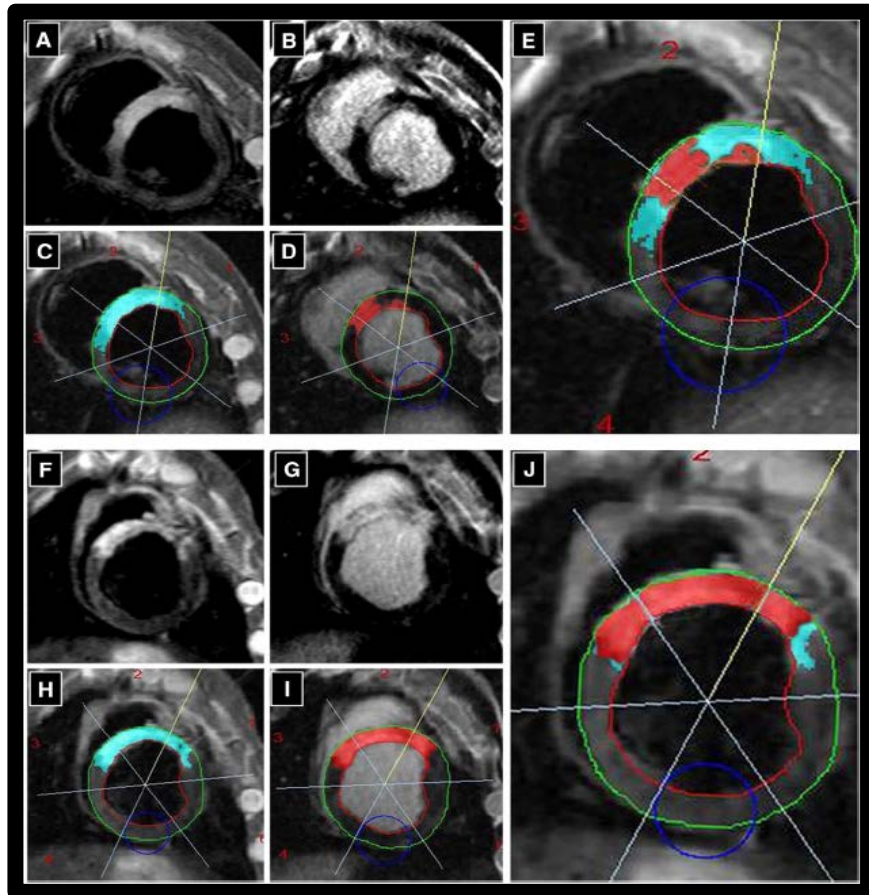
Los análisis de resonancia se realizarán en el laboratorio central de imagen del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Las imágenes se analizarán y los datos se cuantificarán con un software de análisis específico para resonancia cardiaca (QMass MR 7.6; Medis, Leiden, Holanda). Se determinarán los siguientes parámetros del ventrículo izquierdo: Volumen telediastólico y telesistólico, fracción de eyección, extensión del edema y extensión de la necrosis (junto con la obstrucción microvascular).

La fracción de eyección del ventrículo izquierdo será determinada a partir de las imágenes bidimensionales eje corto de SSFP en espiración. Se realizará detección automática con corrección manual de bordes endocárdicos y epicárdicos para el cálculo del volumen telediastólico, volumen telesistólico, masa y fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Las trabeculaciones y músculos papilares del ventrículo izquierdo se incluirán en el departamento de sangre y no en el de pared ventricular.

El análisis de edema miocárdico (para el posterior cálculo del AER y del miocardio salvado) se realizará tras delinear el borde endocárdico y epicárdico en las imágenes STIR de eje corto basándose en la intensidad de señal, definiéndose las áreas anormales (edematosas) con el método de "full width at half-maximum" con corrección manual (182). Así, el software detectará automáticamente el área con mayor señal dentro de la zona edematosa y se utilizará el umbral del 50% de la señal de esta región de interés. La detección y la cuantificación del miocardio edematoso serán automáticas, realizándose corrección manual con especial atención a las áreas de artefacto correspondientes a zonas de flujo lento. Asimismo, las áreas hipointensas dentro de la región edematosa que están en relación con infarto hemorrágico serán incluidas como edema.

El análisis del tamaño del infarto se realizará sobre las imágenes de eco de gradiente de inversión recuperación de realce tardío. Tras delinear manualmente el borde endocárdico y epicárdico de las imágenes de eje corto, el software seleccionará automáticamente una región de interés dentro del miocardio con hiperseñal (infartado) y otra región de interés en el miocardio hipointenso remoto. Tras corrección manual, aquellas regiones con intensidades de señal por encima del "full-width half-maximum" serán consideradas como miocardio necrótico (182). Aquellas áreas hipointensas que aparezcan dentro de las áreas necróticas hiperintensas serán consideradas obstrucción microvascular y se incluirán en el miocardio necrótico.

El miocardio necrosado será definido por la extensión de realce tardío tras la inyección de contraste gadolinio (gramos de tejido), mientras que el miocardio en riesgo será definido por la extensión de edema (gramos de tejido), derivado de las áreas de alta intensidad de señal en las secuencias STIR pre-contraste. El miocardio salvado será definido como la diferencia entre el miocardio en riesgo y el miocardio necrosado normalizado por el miocardio en riesgo. Todas las mediciones serán expresadas en porcentaje de volumen miocárdico total de ventrículo izquierdo. El tamaño del infarto será cuantificado en gramos de tejido, calculado a partir de la fórmula: Volumen x densidad miocárdica, siendo esta 1.05 g/cm^3 .

Figura 2: Ejemplo de cálculo de AER y tamaño del infarto

Ejemplo de cálculo del área en riesgo y tamaño del infarto publicado previamente por nuestro grupo (modelo porcino recibiendo metoprolol y placebo tras oclusión coronaria y reperusión coronaria) (134). Imágenes de resonancia cardiaca en eje corto obtenidas al mismo nivel del ventrículo izquierdo cuatro días después del infarto en animal tratado con metoprolol (A a E) y en animal de brazo placebo (F a J). Las imágenes A y F pertenecen a secuencias STIR donde la hiperintensidad corresponde a edema. Las imágenes B y G pertenecen a secuencias de inversión recuperación tras contraste donde la hiperintensidad corresponde a infarto. Las imágenes C, D, H e I muestran el análisis de las imágenes A, B, F y G respectivamente. Los cuadros E y J muestran de modo simultáneo la extensión de edema (azul) e infarto (rojo) en un animal tratado con metoprolol y en un animal tratado con placebo (J).

5. RESULTADOS

5.1 Estudio de dosis/respuesta

En el estudio de dosis respuesta se usaron 6 animales. Se utilizó Mirabegron al 95% de pureza y se administraron vía intravenosa durante 1 minuto dosis crecientes (5, 10, 50, 500 microgramos/ Kg; estas dosis han sido seleccionadas arbitrariamente en base a experimentos previos que ha realizado el grupo (resultados no publicados)) junto con 100 microlitros de DSMO (+20 cc de solución salina) como vehículo para cada dosis bajo estrecha monitorización hemodinámica con el objetivo de buscar la máxima dosis de fármaco que no provocase efecto hemodinámico importante, definido como variación del 10% respecto a las mediciones obtenidas basalmente. En 4 animales se utilizaron las 4 dosis y en 2 animales sólo las 2 dosis superiores.

Como se puede observar en las cuatro figuras siguientes los cambios hemodinámicos (gasto cardíaco, frecuencia cardíaca, presión arterial sistémica y presión arterial pulmonar) fueron muy sutiles con las dos dosis más bajas, pero significativamente importantes con las dosis más altas en los 5 primeros minutos, normalizándose posteriormente de nuevo los parámetros hemodinámicos.

Dado que la presencia de estos cambios hemodinámicos no favorecen la recuperación inicial del animal durante la reperfusión se decidió utilizar la dosis de 10 microgramos/kg en la fase 2 del estudio.

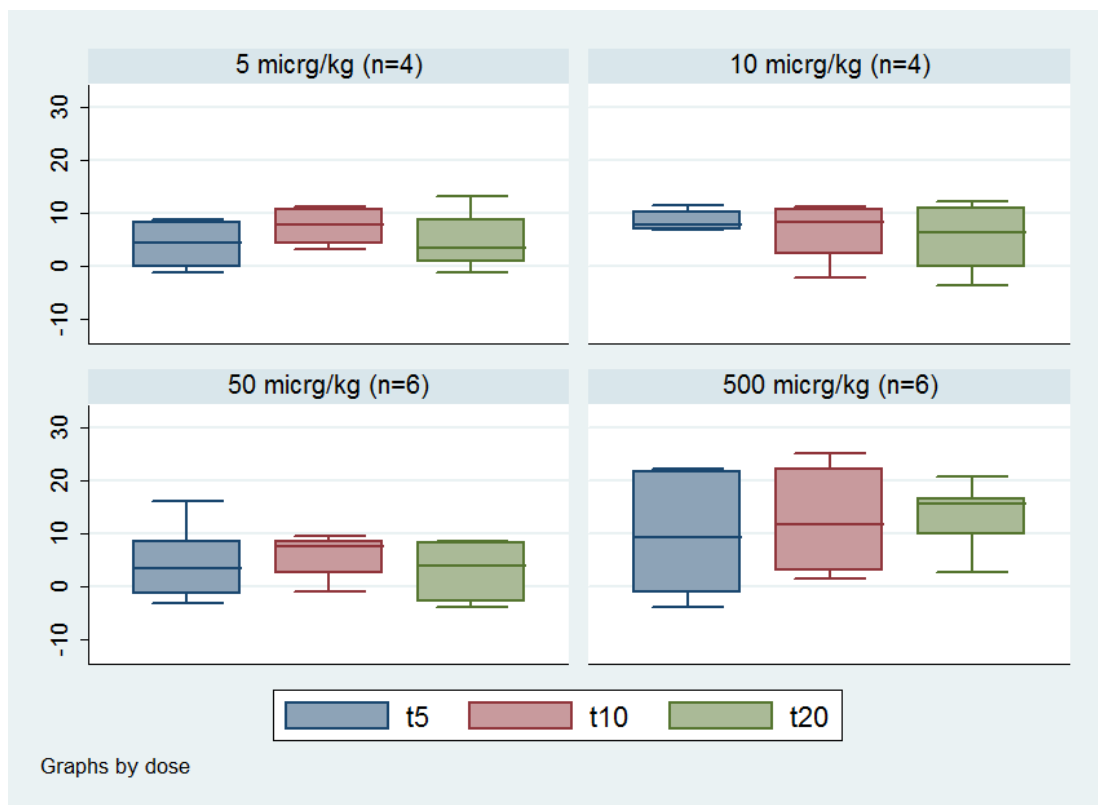
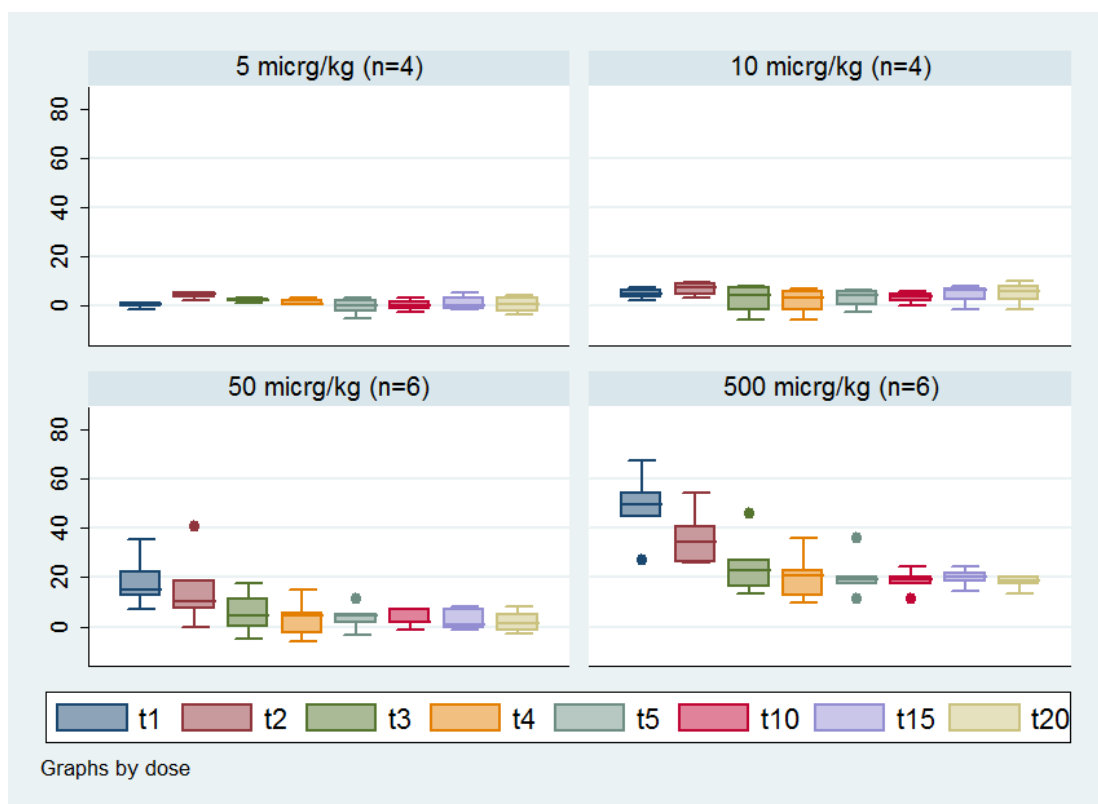
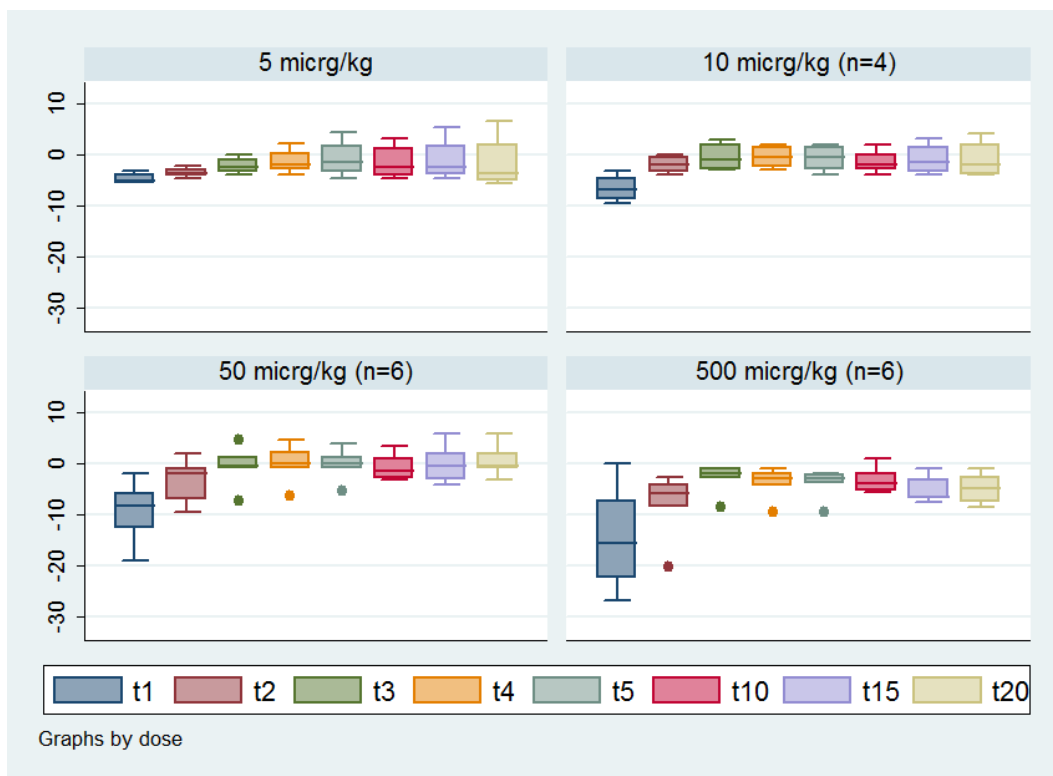
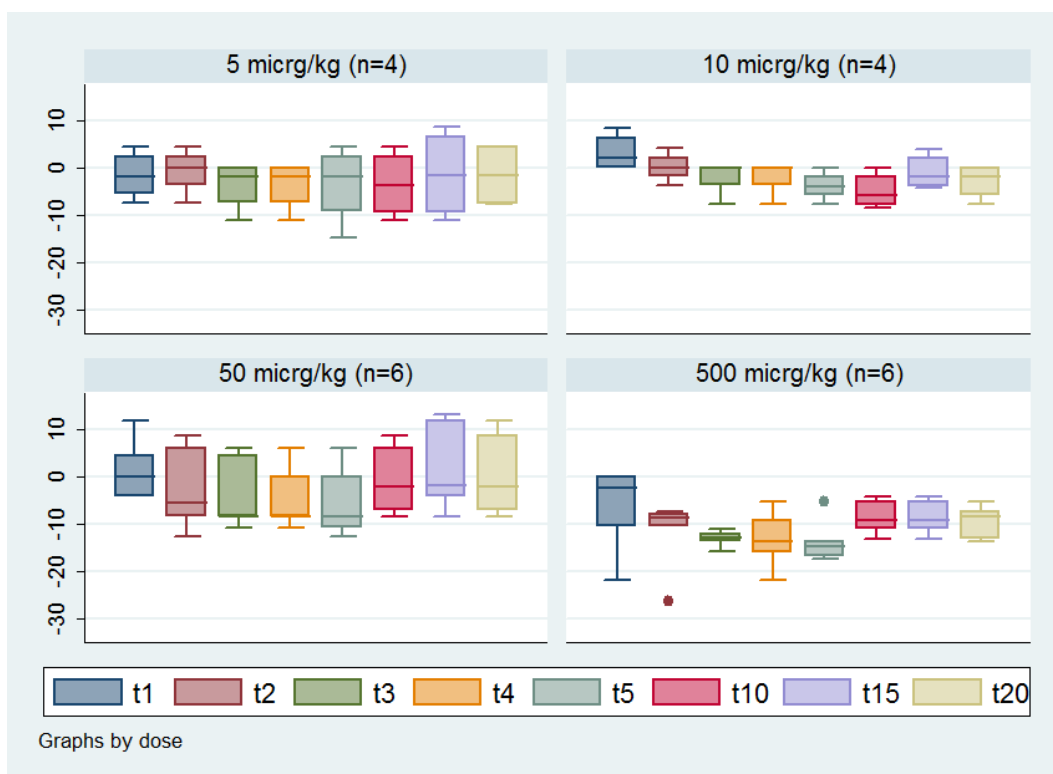
Figura 3: Gasto cardíaco**Figura 4: Frecuencia cardíaca*** $p < 0,05$

Figura 5: Presión arterial sistémica* $p < 0,05$ **Figura 6: Presión arterial pulmonar*** $p < 0,05$

5.2 Estudio de los efectos cardioprotectores de la administración pre-reperusión de Mirabegron en el modelo porcino de Infarto de Miocardio

Se indujo un infarto agudo de miocardio mediante angioplastia percutánea con balón (45 minutos de inflado de balón en la Descendente anterior) seguida de reperusión en 26 cerdos machos castrados de raza *Large-White* (35,7 (1.4) kg), procedentes de la granja del CNIC. Un cerdo murió durante el procedimiento y otros cinco murieron entre el procedimiento y el día 7, por lo que no se les pudo realizar la RMC a día 7, siendo la muestra final del estudio de 20 cerdos. De estos 20 cerdos dos murieron entre el día 7 y el 45 (ambos pertenecientes al grupo de Mirabegron).

Durante el procedimiento no hubo diferencias hemodinámicas estadísticamente significativas entre los cerdos tratados con Mirabegron y placebo. Asimismo los grupos estaban bien equilibrados con respecto al área en riesgo (AER; AAT = "area at risk"): $38,4 \pm 5,9\%$ vs $38,0 \pm 5,6\%$ del ventrículo izquierdo en el grupo de placebo y en el del Mirabegron respectivamente.

En general podemos decir que la administración pre-reperusión de Mirabegron no redujo el tamaño de infarto (a 7 días ni a 45) así como tampoco mejoró la función ventricular ni el remodelado a 45 días.

En el día 7 el tamaño del infarto fue del $35,0 \pm 6,0\%$ del ventrículo izquierdo en el grupo del Mirabegron vs el $35,9 \pm 7,1$ ($p=0,78$) en el del placebo (Figura 7). La fracción de eyección fue del $36,3 \pm 3,3$ en el grupo del mirabegron vs $34,6 \pm 5,7$ ($p=0,43$) en el del placebo (Figura 8) .

En el día 45 el tamaño del infarto fue del $23,7 \pm 6,3\%$ del ventrículo

izquierdo en el grupo del Mirabegron vs el $25,2 \pm 4,5$ ($p=0,58$) en el del placebo (Figura 11). La fracción de eyección fue del $33,1 \pm 5,7$ en el grupo del mirabegron vs 30 ± 7 ($p=0,37$) en el del placebo (Figura 10). El índice de miocardio salvado fue de $37,9 \pm 17,8$ en el grupo de Mirabegron vs $33 \pm 13,8$ en el grupo del placebo (Figura 11).

Todos los datos de la RMC a día 7 y 45 están presentado en las Tablas 1 y 2 y Figuras 7-13.

Tabla 1: datos de la RMC a los 7 días post-infarto

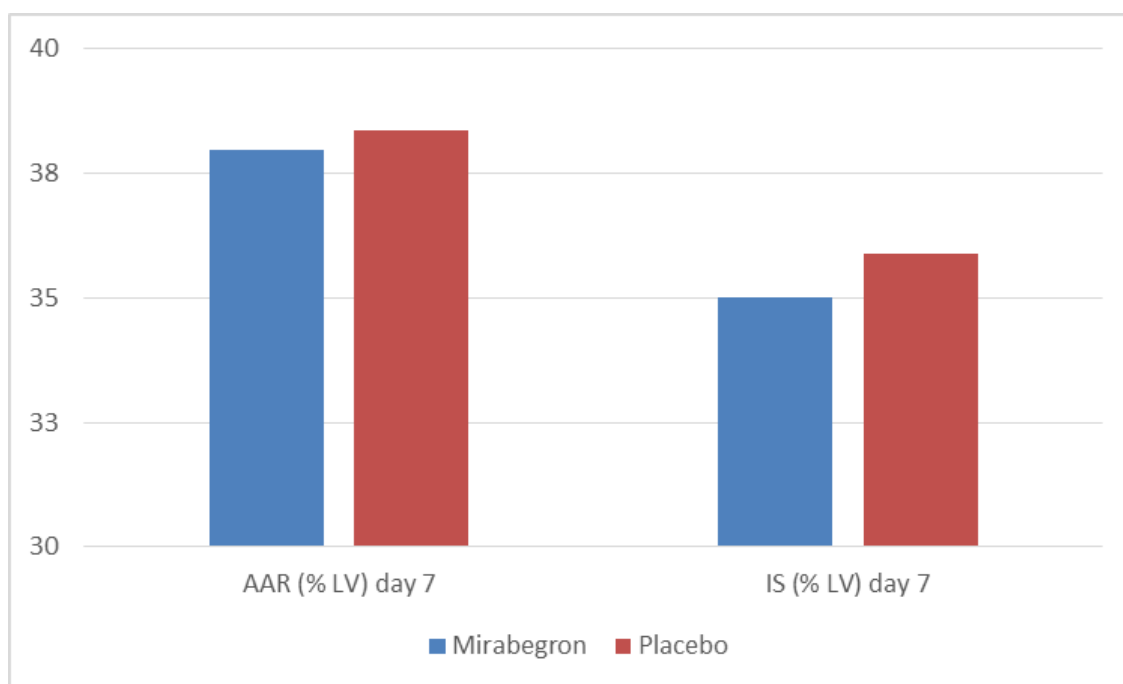
	Mirabegron (N=10)		Placebo (N=10)		P Valor
	Media	SD	Media	SD	
LV mass (g)	66,5	10,4	65,4	6,7	0,80
LVEDV (ml)	127,5	9,7	135,3	19,8	0,31
LVESV (ml)	81,2	7,1	89,2	19,0	0,26
LVEF (%)	36,3	3,3	34,6	5,7	0,43
Edema (g)	27,1	6,1	28,4	6,8	0,66
IS (g)	24,2	6,2	25,2	7,1	0,76
AAR (%LV)	38,0	5,6	38,4	5,9	0,88
IS (%LV)	35,0	6,0	35,9	7,1	0,78
MVO (g)	2,3	1,6	2,1	1,9	0,84

LV mass = masa del ventrículo izquierdo; LVEDV = volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; LVESV = volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; LVEF = fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IS = tamaño del infarto; AAR = área en riesgo; MVO = obstrucción microvascular

Tabla 2: datos de la RMC a los 45 días post-infarto

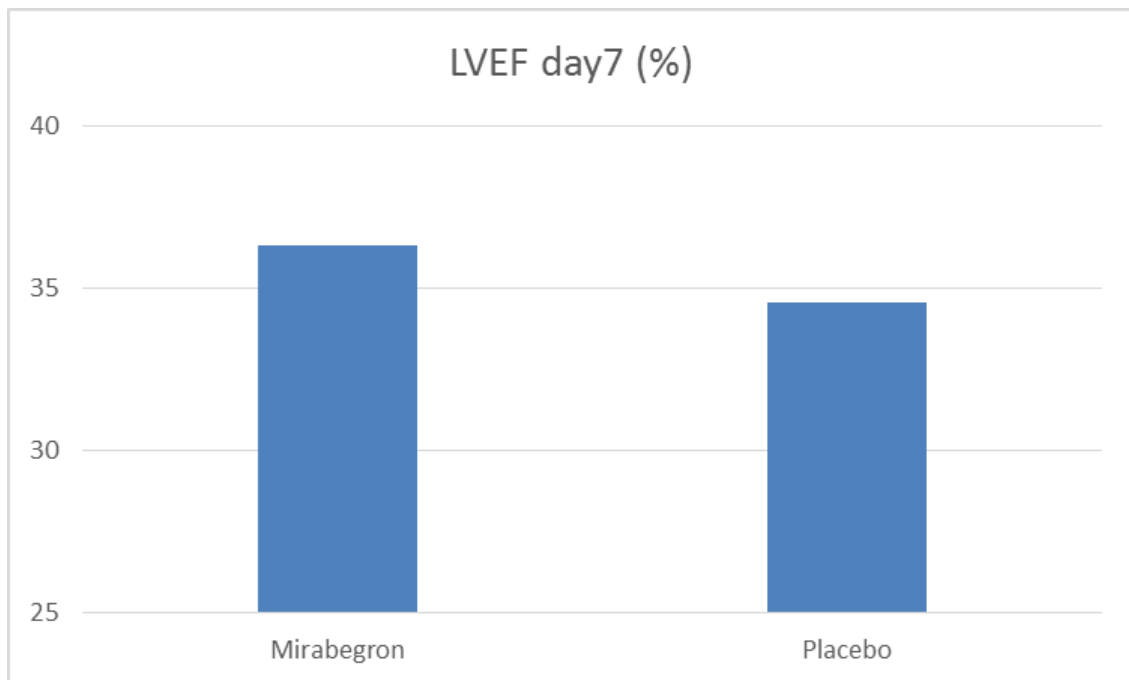
	Mirabegron (N=8)		Placebo (N=10)		P Valor
	Media	SD	Media	SD	
LV mass (g)	71,8	8,9	78,3	12,4	0,26
LVEDV (ml)	187,3	25,5	210,4	47,2	0,26
LVESV (ml)	126,4	26,8	149,4	45,9	0,26
LVEF (%)	33,1	5,7	30,0	7,0	0,37
IS (g)	18,1	5,0	21,6	7,6	0,30
IS (%LV)	23,7	6,3	25,2	4,5	0,58

LV mass = masa del ventrículo izquierdo; LVEDV = volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; LVESV = volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; LVEF = fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IS = tamaño del infarto

Figura 7: Área en riesgo y tamaño del infarto a día 7

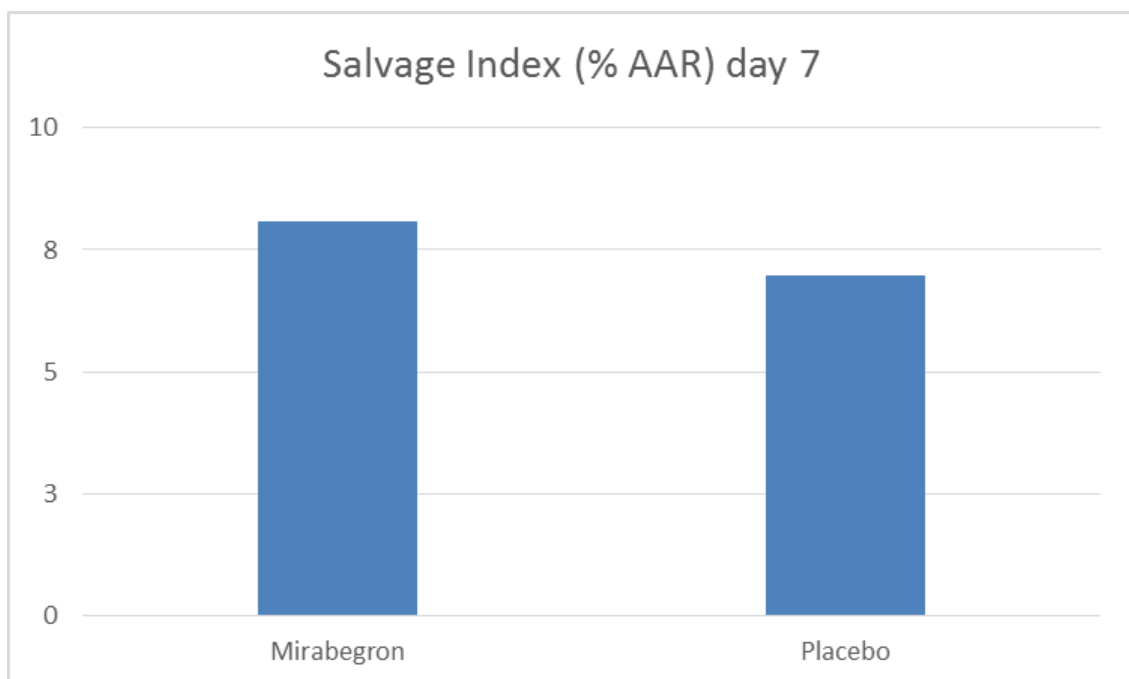
IS = tamaño del infarto; AAR = área en riesgo.

Se puede observar diferencia numérica ligera en el tamaño del infarto a los 7 días a favor del Mirabegron (35±6%) vs placebo (35,9±7%) sin alcanzar la significación estadística (p=0,78).

Figura 8: Fracción de eyección a día 7

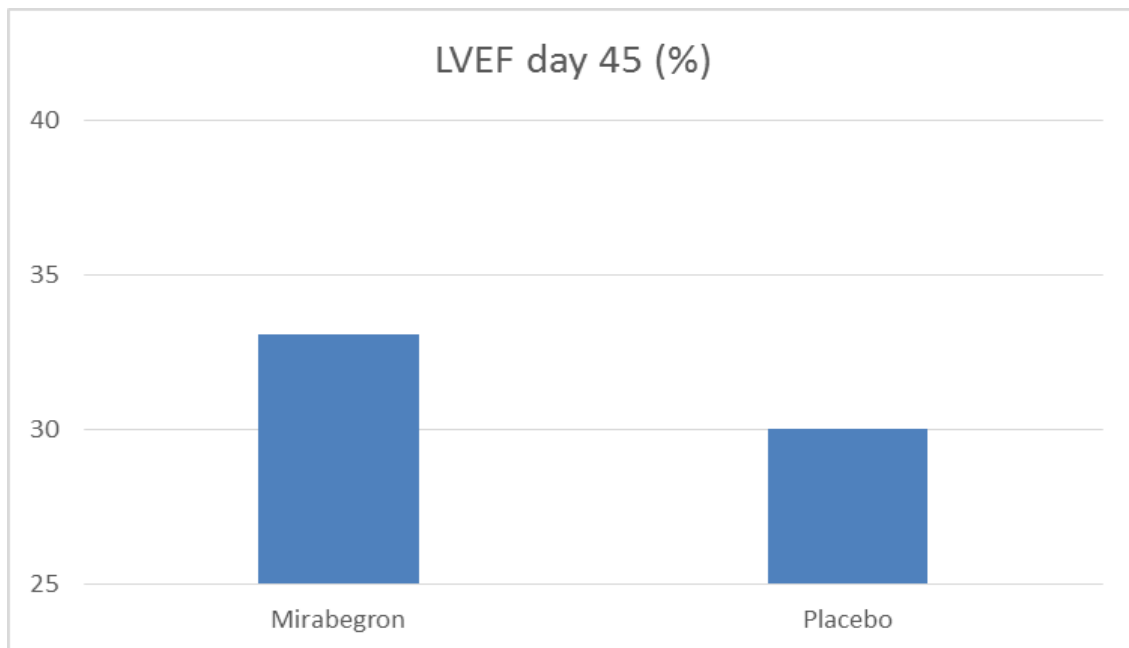
LVEF = fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

Se puede observar diferencia numérica ligera en la fracción de eyección a los 7 días a favor del Mirabegron (36,3±3,3%) vs placebo (34,6±5,7%) sin alcanzar la significación estadística ($p=0,43$).

Figura 9: Salvage Index a día 7

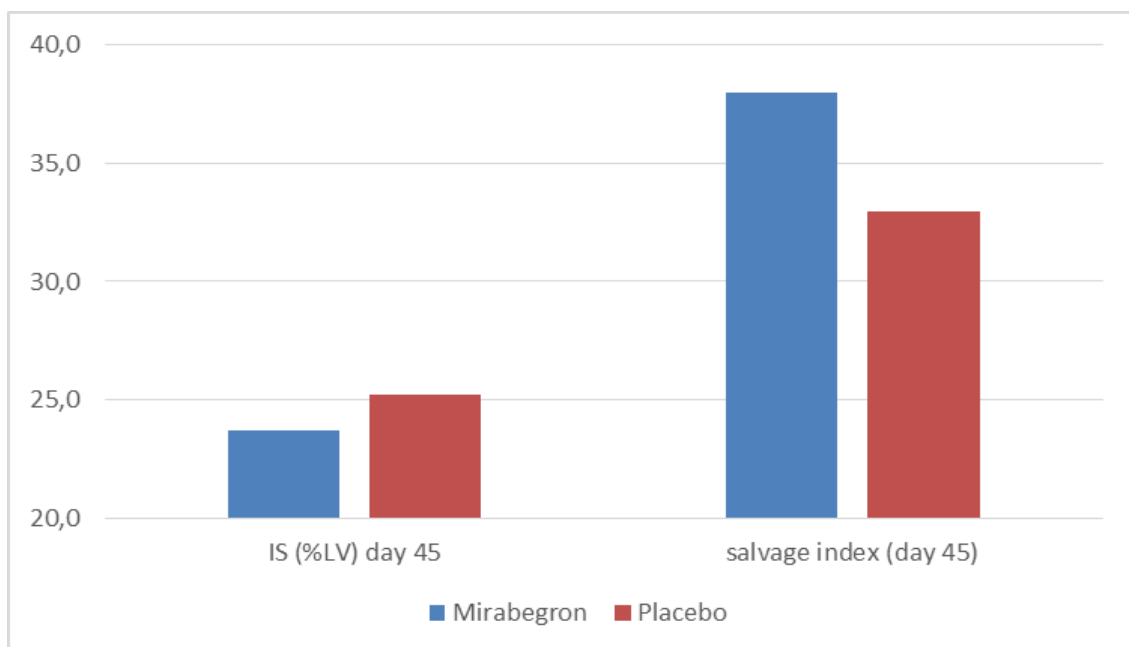
Salvage Index = miocardio salvado (la diferencia entre el miocardio en riesgo y el miocardio necrosado normalizado por el miocardio en riesgo)

Se puede observar diferencia numérica ligera en el miocardio salvado a los 7 días a favor del Mirabegron (8,1±5%) vs placebo (7±6,8%) sin alcanzar la significación estadística.

Figura 10: Fracción de eyección a día 45

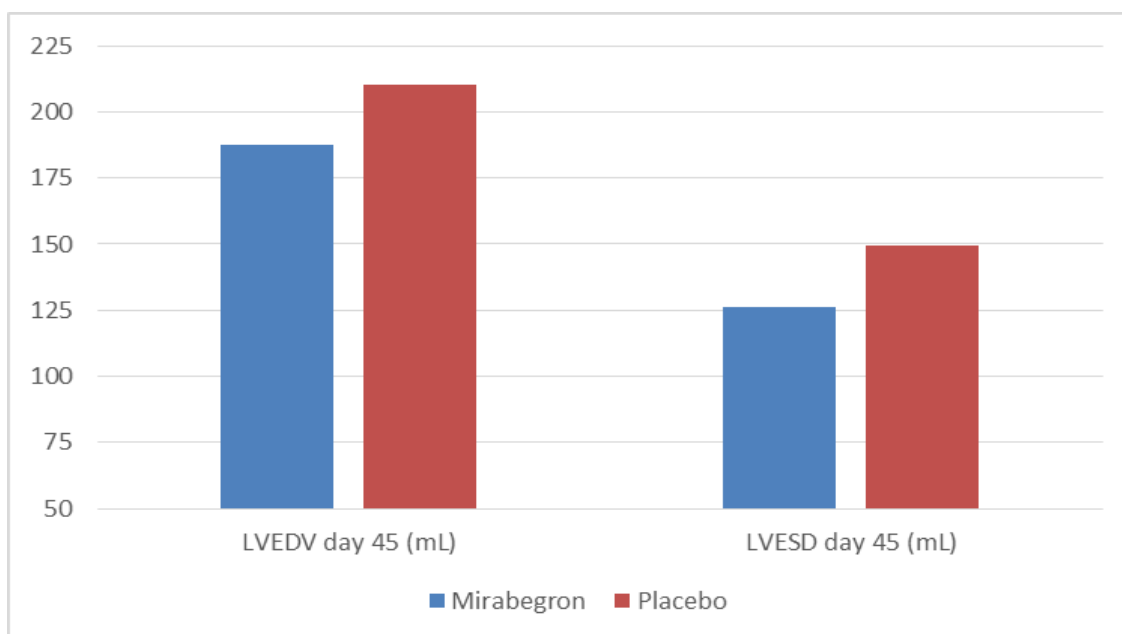
LVEF = fracción de eyección del ventrículo izquierdo

Se puede observar diferencia numérica ligera en la fracción de eyección a los 45 días a favor del Mirabegron (33,1±5,7%) vs placebo (30±7%) sin alcanzar la significación estadística ($p=0,37$).

Figura 11: Salvage Index y tamaño del infarto a día 45

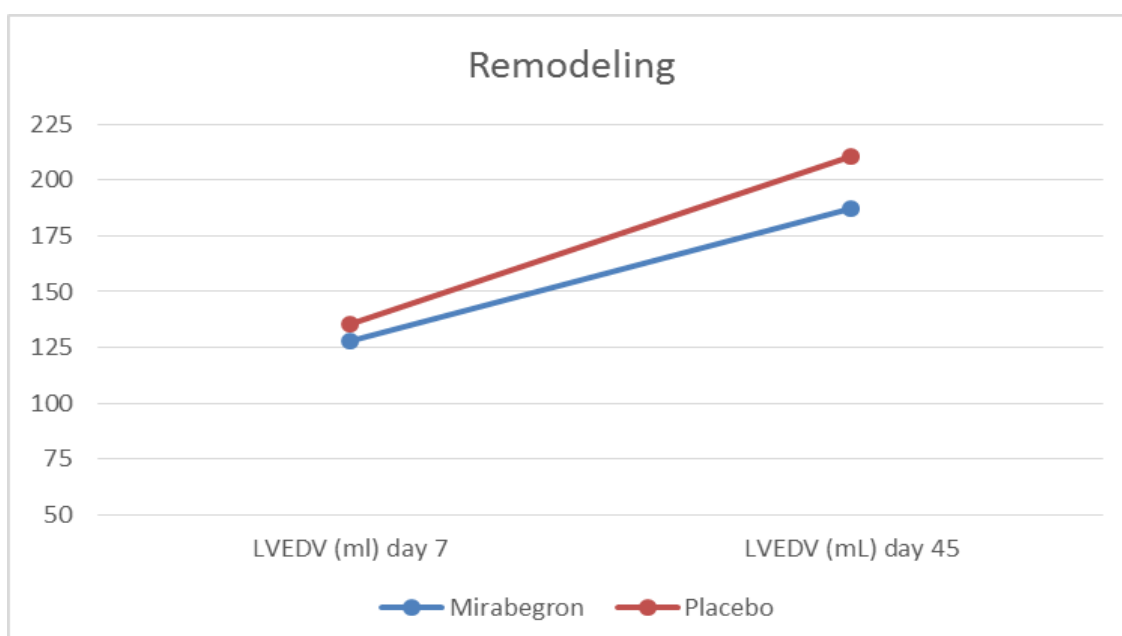
IS = tamaño del infarto; Salvage Index = miocardio salvado (la diferencia entre el miocardio en riesgo y el miocardio necrosado normalizado por el miocardio en riesgo).

Se puede observar diferencia numérica ligera a favor de Mirabegron vs placebo a los 45 días tanto en el miocardio salvado (37,9±17,8% vs 33±13,8 respectivamente) como en el tamaño del infarto (23,7±6,3% vs 25,2±4,5% respectivamente) sin alcanzar la significación estadística ($p=0,58$).

Figura 12: Remodelado ventricular a 45 días

LVEDV = volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; LVESV = volumen telesistólico del ventrículo izquierdo.

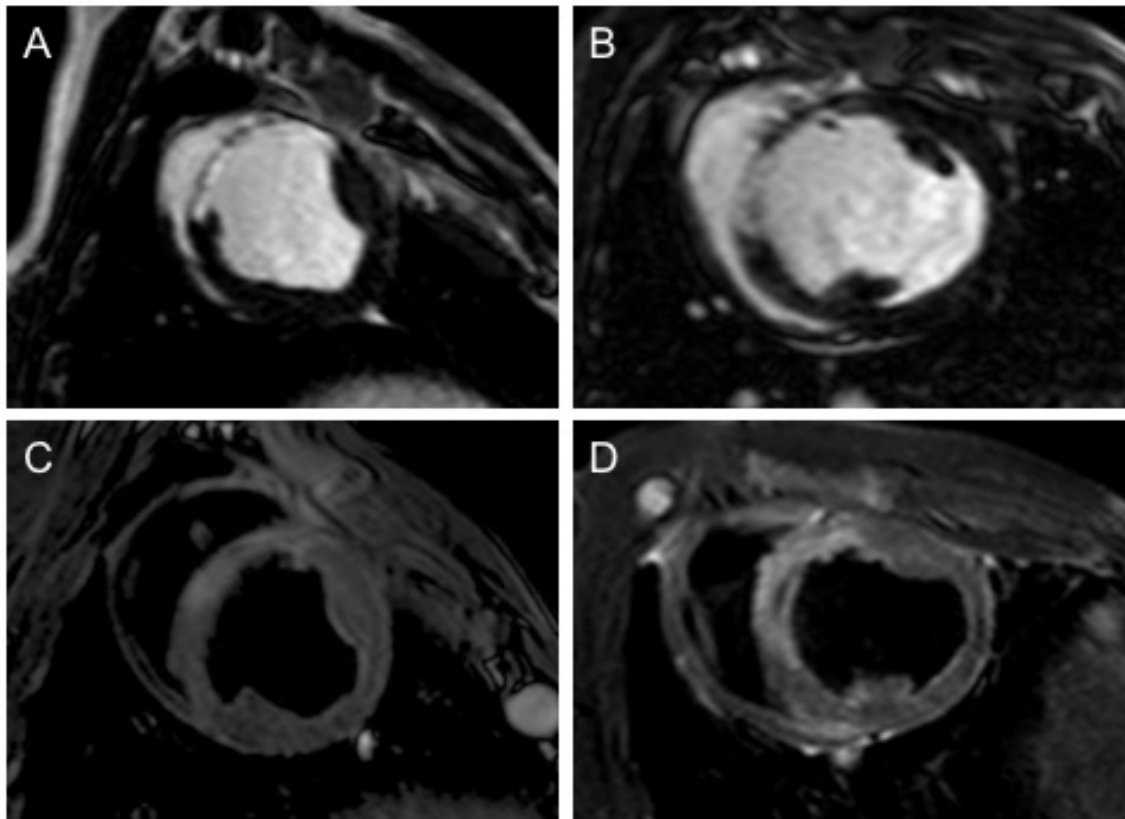
Se puede observar diferencia numérica ligera a favor de Mirabegron vs placebo a los 45 días tanto en el LVEDV ($187,3 \pm 25,5\%$ vs $210,4 \pm 47,2$ respectivamente) como en el LVESV ($126,4 \pm 26,8\%$ vs $149,4 \pm 45,9\%$ respectivamente) sin alcanzar la significación estadística ($p=0,26$).

Figura 13: Evolución de remodelado de día 7 y día 45

Remodeling = remodelado; LVEDV = volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; LVESV = volumen telesistólico del ventrículo izquierdo.

Se puede observar un menor aumento del LVEDV (remodelado) en el Mirabegron vs placebo desde el día 7 ($127,5 \pm 9,7$ vs $135,3 \pm 19,8$ respectivamente; $p=0,31$) al día 45 ($187,3 \pm 25,5\%$ vs $210,4 \pm 47,2$ respectivamente; $p=0,26$).

Figura 14: Ejemplo de edema (7 días) y tamaño de infarto (45 días)



A: placebo (realce tardío a los 45 días); B: Mirabegron (realce tardío a los 45 días)
C: placebo (edema a los 7 días); D: Mirabegron (edema a los 7 días)

6. DISCUSIÓN

6.1. Justificación de usar otro agonista B3

Se necesitan agonistas B3 altamente específicos para probar clínicamente el efecto beneficioso de la activación de los receptores B3-adrenérgicos. Además del corazón, los B3AR se expresan en células de músculo liso de la vejiga urinaria, donde median la relajación del músculo detrusor, mejorando así la capacidad de llenado de la vejiga. Recientemente, se ha desarrollado y aprobado un nuevo agonista específico de los B3AR humano, el mirabegron, en Europa, Estados Unidos y Japón para el tratamiento de la enfermedad de la vejiga hiperactiva. Esta condición urológica se caracteriza por una micción frecuente y aquí se ha demostrado que el fármaco mejora el llenado de la vejiga a través de sus propiedades miorrelajantes mediada por la activación de los B3AR en el músculo detrusor (164). Este fármaco tiene una especificidad superior (para B3AR en comparación con β 1-2AR) comparado con otros agonistas, con una biodisponibilidad bien documentada y poco potencial de generar efectos adversos resultantes de las interacciones medicamentosas. El mirabegron es metabolizado por CYP3A4 y es un (débil) inhibidor de CYP2D6 y P-GP; También se elimina por excreción urinaria. Además, los datos clínicos de los estudios clínicos de mirabegron en la enfermedad de vejiga hiperactiva señalaron que no había complicaciones cardiovasculares en las poblaciones de ensayos clínicos. Tras el tratamiento con mirabegron, se observó un aumento de aproximadamente 1 lpm en la frecuencia cardíaca y un aumento de la presión arterial sistólica <1 mmHg que no se asoció con un aumento de las complicaciones cardiovasculares (Agencia Europea de Medicamentos mirabegron EPAR informe EMA / 706651/2012).

El desarrollo existente en humanos de este agonista específico (mirabegron) junto con los resultados positivos sobre reducción del

tamaño del infarto y mejora de la función ventricular en un modelo de I/R porcino observados con el BRL37344 (otro agonista B3 pero de uso exclusivo experimental) (181) ha sido nuestro incentivo para realizar el estudio actual. Como ya comentamos anteriormente, los ensayos clínicos piloto en humanos sólo se justifican cuando se encuentran beneficios sólidos e indiscutibles en los modelos de animales grandes.

6.2. Posibles razones por las que los resultados del BRL37344 han sido positivos en estudios previos y los del Mirabegron neutros en nuestro estudio a pesar de ser igualmente un B3 agonista.

6.2.1 El producto y su administración vía intravenosa.

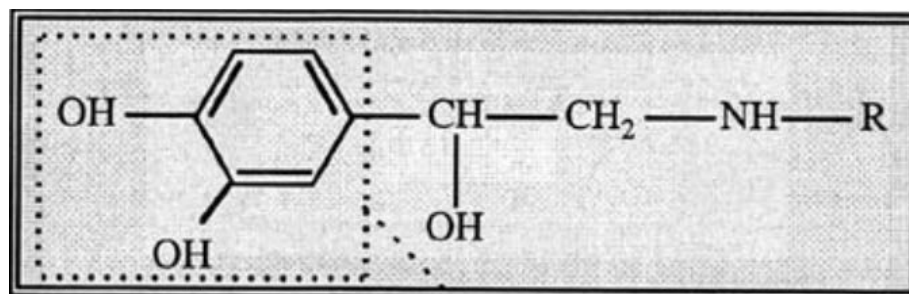
Como hemos comentado el Mirabegron está ya comercializado para su uso en humanos (vejiga hiperactiva) y su única vía de administración es oral. Para poder realizar un estudio traslacional teníamos que dar el producto vía intravenosa. De esta manera nos cerciorábamos que lo administrábamos inmediatamente antes de la reperfusión, asegurándonos las concentraciones adecuadas del fármaco durante ésta. Para conseguir administrarlo vía i.v. de manera eficaz teníamos que producir un compuesto administrable por esa vía, por lo que no nos valía el producto ya comercializado. Por ello, compramos polvos de Mirabegron al 95% de pureza y los preparamos en nuestro laboratorio. ¿Pudo influir este proceso en que los resultados hayan salido neutros? Es una posibilidad, aunque pensamos que es poco probable dado que se realizó un estudio dosis respuesta previo con el producto elaborado, evaluando diferentes dosis de este producto y utilizando la dosis más adecuada que provocaban menos cambios hemodinámicos en los animales.

6.2.2 Afinidad por el receptor B3.

Otra posible explicación para la neutralidad de nuestro estudio es que el agonista BRL37344 y mirabegron tengan afinidad diferente por el receptor B3.

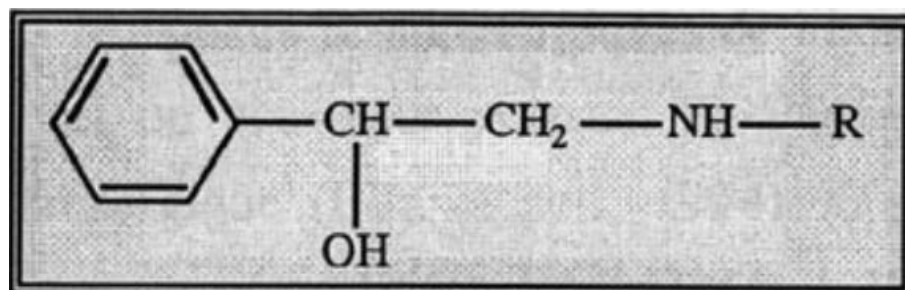
Como ya hemos comentado, los receptores B3 se activan por catecolaminas, pero a concentraciones más altas que los B1 y B2, sugiriendo que la activación de los B3 se producen en momentos de aumento de tono catecolaminérgico (183). Además de las catecolaminas, existen otros agonistas B3 selectivos, que activan los receptores con gran afinidad y potencia:

- Las Catecolaminas



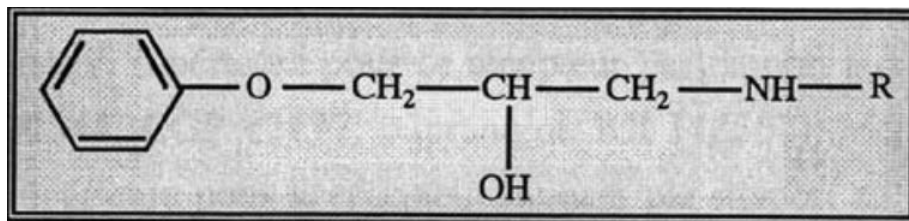
Agonistas B adrenérgicos no selectivos (B1/B2/B3):
epinefrina, norepinefrina, isoproterenol

- Phenylethanolamines



Agonistas B3 preferenciales: BRL 37344, SR 58611A, CL 316 243, YM 178 (mirabegron)

- Aryloxypropanolamines



Agonsita B3 preferencial: L 755,507, ICI 201,651

Agonsita B3 Parcial: CGP 12177A, L 755,507, pindolol

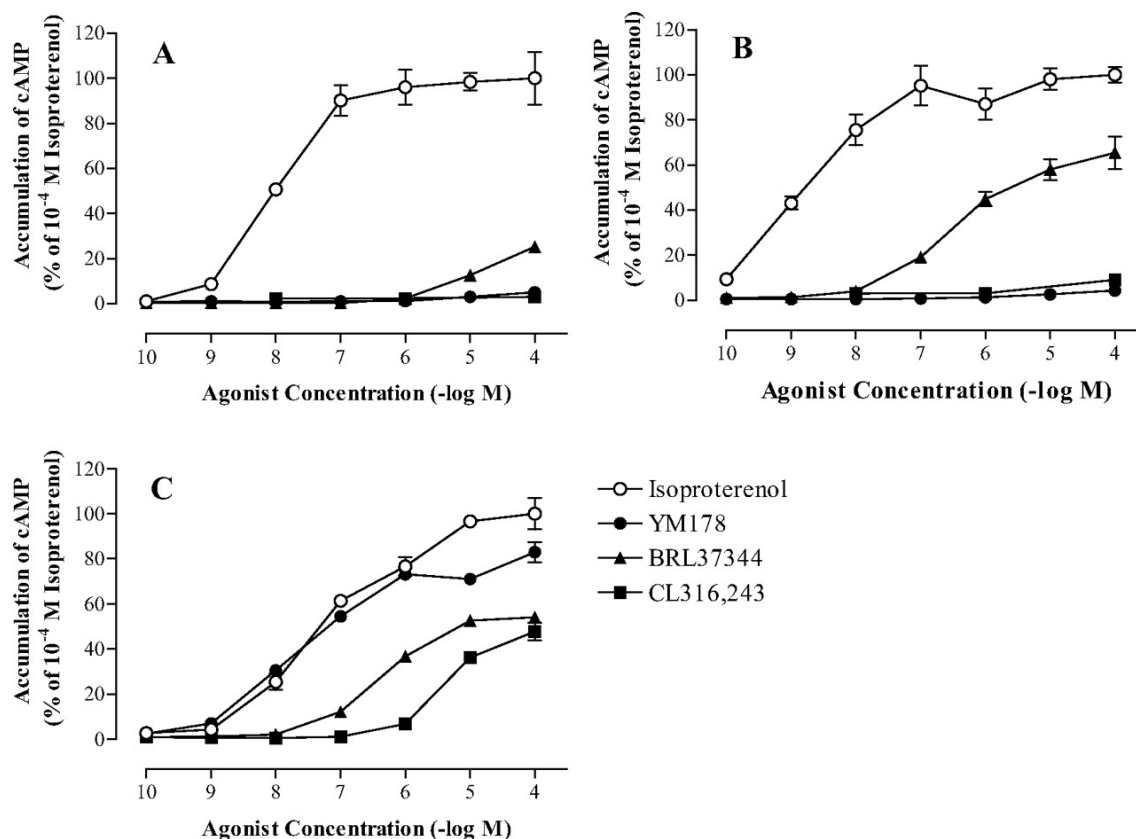
Como se puede observar, tanto el BRL 37344 como el Mirabegron (YM178) pertenecen al grupo de las Phenylethanolaminas. Los estudios realizados in vitro e in vivo hace años describieron la gran complejidad de la farmacología de los receptores B3, sugiriendo una pronunciada variabilidad entre especies y la existencia de perfiles farmacológicos heterogéneos de los agonistas B3 según la especie. Por ejemplo, los agonistas muestran diferencias significativas en la eficacia y la potencia entre los receptores B3 del roedor y del humano. Además la afinidad y la potencia pueden diferir según el ensayo que se haga (algunos agonistas B3 se han evaluado midiendo la acumulación de cAMP en células enteras transfectadas con receptores B3 humanos, mientras que otros se probaron en membranas aisladas para medir la producción de cAMP por adenyl ciclase) (184). Por lo tanto no parece descabellado pensar que el BRL 37344 y el Mirabegron tengan afinidades y potencias diferentes y que esto haya podido influir en el resultado de este trabajo, saliendo negativo en este caso.

6.2.3 Diferencias en el agonismo B2.

Pero no sólo ha podido influir la potencia y la afinidad de los agonistas por los receptores B3, sino que también ha podido influir las diferencias en el agonismo por los receptores B2. Desde hace ya tiempo se sabe que algunos agonistas B3 tienen cierto agonismo B1 y sobre todo B2 (185). Como se puede ver en la siguiente gráfica el BRL 37344 tiene un pequeño efecto B1, un efecto B2 no despreciable (el mirabegron

(YM178) no tiene efecto ni B1 y B2), mientras que la potencia por el receptor B3 es menor que la del mirabegron (186).

Figura 15: Diferencias en el agonismo B2



Takasu et al, J Pharmacol Exp Ther. 2007 (186)

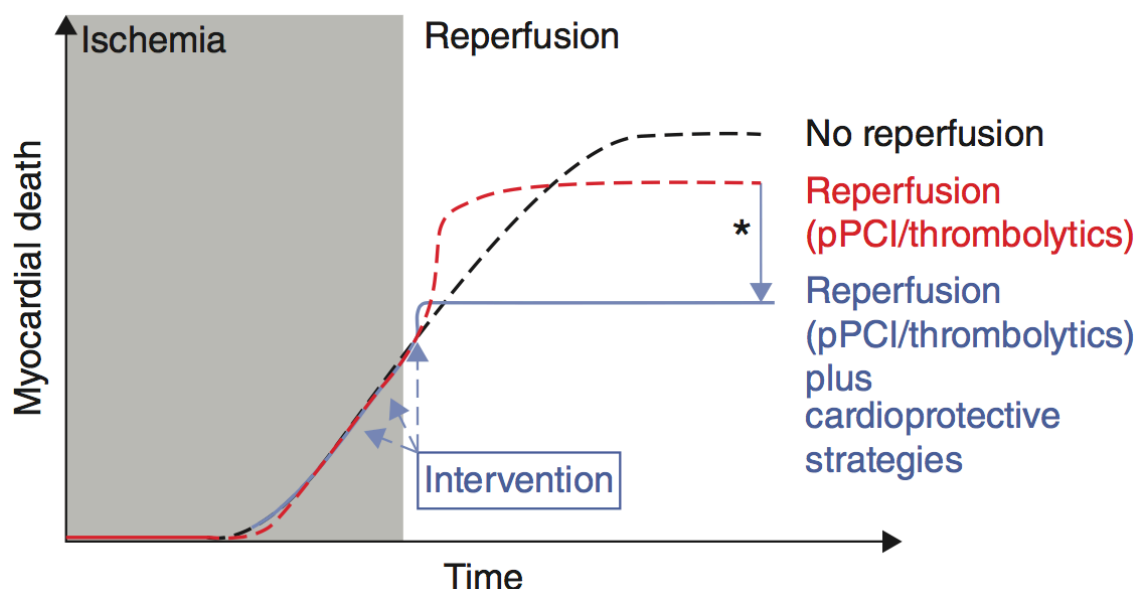
YM178 = Mirabegron

Acumulación de cAMP en células CHO (células de ovario de hámster chino) que expresan β_1 -AR (A), β_2 -AR (B) y β_3 -AR (C). Los datos se expresan como porcentaje con respecto a la acumulación máxima de AMPc inducida por isoproterenol 10^{-4} M. Cada punto representa la media \pm S.E.

¿Podría ser que el efecto cardioprotector observado con el BRL 37344 fuera en parte secundario a su agonismo B2? Dado que el mirabegron no tiene esta afinidad B2, esto podría explicar los resultados dispares. Aun siendo esto posible nos parece poco probable puesto que en el artículo de García Prieto et al. (181) no se consiguió efecto cardioprotector del BRL 37344 en ratones KO para B3, sugiriendo que el efecto cardioprotector se basa en el agonismo B3.

6.2.4 Variaciones en el modelo porcino de infarto

Figura 16: Impacto de la lesión por reperfusión en el tamaño final del infarto



Adaptada del *Cardiovasc Res.* 2006;69:1-3 (187)

En esta figura vemos el impacto de la lesión por reperfusión en el tamaño final del infarto. La muerte miocárdica durante la oclusión coronaria aumenta exponencialmente con el tiempo. La isquemia no resuelta (sin reperfusión) resulta en la muerte de toda la zona de riesgo (línea negra). La reperfusión, ya sea mecánica por angioplastia primaria (intervención coronaria percutánea primaria [pPCI]) o farmacológica por trombolíticos, resulta en rescate del miocardio y reducción del tamaño del infarto en comparación con la ausencia de reperfusión (línea roja). La lesión por reperfusión se suma a la lesión desarrollada durante la isquemia inicial (observar la progresión de la muerte de la línea roja inmediatamente después de la reperfusión). Si conseguimos anular el daño relacionado con la reperfusión con las estrategias cardioprotectoras, el tamaño del infarto no progresa después de la reperfusión (línea azul). La diferencia entre el tamaño

del infarto presentado en las líneas roja y azul es la contribución de la lesión por reperfusión al tamaño final del infarto (representado por el asterisco). La administración de una terapia dada en cualquier momento antes de la reperfusión (incluso inmediatamente antes) puede atenuar la lesión por reperfusión.

Por lo tanto sabemos que cuanto más tiempo de isquemia, más muerte miocárdica, pero la evolución del infarto varía con las especies y depende de la existencia y extensión de la circulación colateral. Los perros tienen una circulación colateral nativa bien desarrollada y el infarto comienza después de 40 minutos de oclusión coronaria y se extiende hasta afectar el 70% del AER después de 6 horas (35). Los cerdos tienen una circulación colateral nativa insignificante y el infarto comienza después de 15 a 35 minutos de oclusión coronaria y afecta $\geq 80\%$ del AER después de 60 minutos (32). Los primates tienen poca circulación colateral pero son relativamente resistente a la isquemia miocárdica; No hay infarto después de 40 a 60 minutos de oclusión coronaria e incluso después de 90 minutos de oclusión coronaria, el tamaño del infarto es menor que en los cerdos (34). Afortunadamente, el desarrollo del infarto en los seres humanos es más lento que en estos grandes mamíferos. Incluso después de 4 a 6 horas de oclusión coronaria, el 30% al 50% del AER sigue siendo viable y por lo tanto salvable.

Teniendo esto en cuenta y a medida que hemos ido entendiendo mejor la evolución del infarto en nuestro modelo porcino de isquemia, éste ha ido ajustándose en el tiempo realizando algunos cambios, siendo dos de ellos notorios: la anestesia y el tiempo de isquemia.

Respecto a la anestesia, primero se anestesiaba a los cerdos con gases inhalados (isoflurano). Dado que se ha visto que estos gases tienen efecto cardioprotector (188) y ante la dificultad de estandarización de la cantidad de gas administrado durante la anestesia se decidió pasar

a anestesia i.v. (como se ha descrito previamente). Tanto el estudio de García-Prieto et al (181) con el BRL 37344 como el nuestro ya utilizan anestesia i.v., por lo que aquí no puede estar la diferencia de los resultados.

Respecto al tiempo de isquemia, éste si ha cambiado. Cuando comenzamos con los primeros modelos de isquemia en cerdo utilizábamos 90 minutos isquemia (2007; (134)). Posteriormente este tiempo se ha reducido a 60 minutos de isquemia (lo utilizado por García-Prieto et al con el BRL 37344) y finalmente a 45 minutos (García-Ruiz et al. (189) y nuestro estudio). Hemos visto que con este tiempo de isquemia conseguimos igualmente un infarto transmural pero afectando a menor cantidad de AER, con lo que tenemos más ventana de protección, es decir, más capacidad para salvar miocardio con las terapias probadas, haciendo este modelo más traslacional. ¿Ha podido influir este ligero cambio en el tiempo de oclusión de la arteria en la diferencia de efecto observado entre el BRL 37344 y el Mirabegron? Esto parece poco probable, ya que con lo comentado anteriormente, precisamente podríamos esperar el efecto contrario, es decir, más cardioprotección con Mirabegron.

6.2.5 Operadores diferentes a la hora de realizar el procedimiento de isquemia en el modelo porcino.

De nuevo pensamos que es poco probable que esto explique los resultados neutros de nuestro estudio con Mirabegron respecto al estudio del BRL 37344, porque todos los operadores que han realizado los diferentes estudios han sido siempre ciegos al tratamiento.

6.2.6 Tamaño muestral

Como hemos podido observar en los resultados, hay diferencias numéricas ligeras a favor de Mirabegron en prácticamente todos los parámetros estudiados, por lo que nos podría asaltar la duda de si el

estudio hubiese salido significativo con una muestra más amplia. Con los resultados obtenidos sería planteable realizar un nuevo cálculo de tamaño muestral para realizar un nuevo estudio con mayor potencia.

6.3 Importancia de los estudios negativos (tanto tesis como artículos de revista)

Lamentablemente, existe una tradición en investigación en salud a publicar resultados "positivos", lo cuál ha llevado al reconocido sesgo de publicación (190). Éste tiene como sus más graves consecuencias, la generación de conclusiones erradas en las revisiones de la literatura, en las que se basan hoy muchas decisiones clínicas y políticas, al ser excluidas en estas generalmente aquellos artículos originales que hacen parte de la denominada "literatura gris", la cuál está mayoritariamente constituida por estudios originales con hallazgos negativos, al resultar la publicación de estos, menos atractiva para los autores, pero sobre todo para las revistas científicas (191). En muchos casos, incluso podría pasar que los autores se sientan desmotivados incluso para escribir un borrador del artículo, por "no tener un hallazgo", cuando no encontrar algo, constituye un resultado valioso para el conocimiento científico, cuando se ha hecho con rigor.

La situación es importante, dado que la tendencia a publicar resultados positivos generaría estímulos perversos, ya que puede llevar a los autores, de modo consciente o inconscientemente, a abusar de los métodos estadísticos, hacer mala práctica metodológica, o a la "minería" indiscriminada de datos, hasta "encontrar" resultados coherentes con sus prejuicios, afectando el rigor y la calidad de los análisis, lo cuál rara vez puede ser verificado por los evaluadores. Esto podría producir un efecto de bola de nieve, favoreciendo la publicación de estudios, con el mismo sesgo, por el hecho de "encontrar"

resultados similares, algo que conduce solamente a la "confirmación" de un error.

Sin embargo, un resultado negativo, que no es coherente con los hallazgos previos, puede significar varias cosas, no siempre fáciles de establecer en cada caso particular, que podrían resumirse en lo siguiente: 1) Azar (Error Tipo II) en especial cuando hay poco tamaño de muestra, con bajo poder. 2) Sesgo, aunque habitualmente el sesgo nos hace concluir cosas erróneas, también puede oscurecer una asociación existente o una estructura factorial, lo cual puede darse tanto por error de medición como por confusión. Y finalmente: 3) la hipótesis nula es realmente verdadera, en efecto. Los autores en la práctica cuando no encuentran lo que esperaban según la literatura científica -que regularmente es un hallazgo positivo- tienden a pensar más en las primeras dos opciones como las explicaciones más plausibles, pero es importante reconocer que la tercera opción siempre permanecerá vigente.

Por lo tanto se tiene la creencia generalizada de que "cómo voy a escribir este trabajo si ha salido negativo". Creo sinceramente que es un error profundo. No cabe duda de que es más emocionante transmitir unos resultados positivos, pero puede ser igual de importante transmitirlos aunque sean negativos. Por varias razones:

a. Desde el punto de vista del investigador/doctorando:

- *Estimular la autocrítica e incrementar la autoestima.* La autoexigencia frente a la expresión coherente y clara de los resultados es el un reto para el autor y su felicidad. Un investigador feliz es un investigador que continuará en la búsqueda del conocimiento.
- *Generar nuevas habilidades.* En la redacción científica se desarrollan habilidades como: capacidad para realizar búsquedas avanzadas de información, facilidad de síntesis del

conocimiento primario y secundario, capacidad para ordenar clara y coherentemente nuestros pensamientos, análisis crítico de los datos obtenidos e integración de estos con los producidos por otros investigadores. Habilidades que pueden ser transferidas a la práctica profesional.

- *Fomentar la educación continua.* Cuando se escribe un artículo/tesis se adquieren y actualizan nuevos conocimientos producto de la revisión del estado del arte, contribuyendo a la formación propia y de los lectores. Por lo tanto, la publicación científica, aunque sea neutra/negativa es una valiosa herramienta que facilita la continuidad en los procesos de educación.
- *Contribuir al mejoramiento de la calidad en la práctica profesional.* Sin ser el objeto primario de la comunicación científica, el autor busca además de su formación académica, elementos cognitivos para ejercer una aplicación práctica de nuevos conocimientos.

b. Desde el punto de vista de la comunidad científica

Contribuir a la construcción colectiva del conocimiento. Hay un refrán español que dice que saber es poder y esta expresión de la sabiduría popular ha adquirido categoría científica en los últimos 50 años. Cuando se publica un artículo original/tesis con resultados tanto positivos como negativos se hace un aporte a la generación del conocimiento, ayudando al resto de la comunidad científica a orientar sus trabajos, contribuyendo a que otros investigadores avancen en un campo específico de investigación.

6.4 ¿Y ahora qué? El futuro del uso del Mirabegron

El objetivo de este estudio era ser traslacional. Dado que ha salido neutro y a pesar de la ligera diferencia numérica a favor del Mirabegron no está en nuestro ánimo el continuar con el estudio de este fármaco en el contexto del infarto agudo de miocardio.

El Mirabegron está siendo estudiado en el contexto de la IC (hay algún ensayo clínico en humanos que ha salido negativo (192) y están otros en marcha) y de la Hipertensión pulmonar. Este último campo parece ser bastante prometedor y ya tenemos resultados positivos para la reducción de la hipertensión pulmonar en un modelo porcino (169). Además nuestro grupo ha comenzado con un ensayo clínico en humanos en pacientes con hipertensión pulmonar tipo 2 que están siendo aleatorizados a Mirabegron o placebo. Los esfuerzos del grupo están centrados ahora mismo en esta línea.

Asimismo se están desarrollando otros agonistas B3 para la vejiga hiperactiva (por ejemplo: solabegron, amibegron) que podrían tener efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular.

7. CONCLUSIÓN

1. En un modelo traslacional (porcino) de isquemia/reperfusión miocárdica, la administración del agonista de receptores B3 adrenérgicos Mirabegron, un fármaco aprobado y utilizado en humanos para la vejiga hiperactiva, resultó en una reducción no significativa del tamaño del infarto a los 7 y 45 días en comparación con placebo.
2. La administración de Mirabegron pre-reperfusión resultó en una mejora no significativa de los volúmenes ventriculares y la fracción de eyección a largo plazo en comparación con placebo.
3. Estos resultados no justifican el salto a un ensayo clínico en pacientes sufriendo un infarto agudo de miocardio.

8. REFERENCIAS

1. Steg PG, James SK, Atar D et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2012;33:2569-619.
2. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:485-510.
3. Wu E, Ortiz JT, Tejedor P et al. Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index: prospective cohort study. *Heart* 2008;94:730-6.
4. Kelle S, Roes SD, Klein C et al. Prognostic value of myocardial infarct size and contractile reserve using magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1770-7.
5. Larose E, Rodes-Cabau J, Pibarot P et al. Predicting late myocardial recovery and outcomes in the early hours of ST-segment elevation myocardial infarction traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2459-69.
6. Rubenstein JC, Ortiz JT, Wu E et al. The use of periinfarct contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging for the prediction of late postmyocardial infarction ventricular dysfunction. *American Heart Journal* 2008;156:498-505.
7. Fox KA, Carruthers KF, Dunbar DR et al. Underestimated and under-recognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK-Belgian Study). *Eur Heart J* 2010;31:2755-64.
8. Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 2006;333:1091.
9. Atar D, Petzelbauer P, Schwitter J et al. Effect of intravenous FX06 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction results of the F.I.R.E. (Efficacy of FX06 in the Prevention of Myocardial Reperfusion Injury) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:720-9.
10. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2013;128:1810-52.

11. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 2012;33:1787-847.
12. Eapen ZJ, Tang WH, Felker GM et al. Defining heart failure end points in ST-segment elevation myocardial infarction trials: integrating past experiences to chart a path forward. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes* 2012;5:594-600.
13. Callender T, Woodward M, Roth G et al. Heart failure care in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine* 2014;11:e1001699.
14. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 2013;381:166-175.
15. Kloner RA. Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circulation Research* 2013;113:451-63.
16. Schuster A, Morton G, Chiribiri A, Perera D, Vanoverschelde JL, Nagel E. Imaging in the management of ischemic cardiomyopathy: special focus on magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:359-70.
17. Ridgway JP. Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson* 2010;12:71.
18. Rajiah P, Bolen MA. Cardiovascular MR imaging at 3 T: opportunities, challenges, and solutions. *Radiographics* 2014;34:1612-35.
19. Ahmed S, Shellock FG. Magnetic resonance imaging safety: implications for cardiovascular patients. *J Cardiovasc Magn Reson* 2001;3:171-82.
20. Nagel E, Underwood R, Pennell D et al. New developments in non-invasive cardiac imaging: critical assessment of the clinical role of cardiac magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 1998;19:1286-93.
21. Croisille P, Revel D, Saeed M. Contrast agents and cardiac MR imaging of myocardial ischemia: from bench to bedside. *Eur Radiol* 2006;16:1951-63.
22. Nacif MS, Arai AE, Lima JA, Bluemke DA. Gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance: administered dose in relationship to United States Food and Drug Administration (FDA) guidelines. *J Cardiovasc Magn Reson* 2012;14:18.
23. Shellock FG, Kanal E. Safety of magnetic resonance imaging contrast agents. *J Magn Reson Imaging* 1999;10:477-84.
24. Thomsen HS, Morcos SK, Almen T et al. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast media: updated ESUR Contrast Medium Safety Committee guidelines. *Eur Radiol* 2013;23:307-18.

25. Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A, Levkau B, Schulz R, Erbel R. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder. *Cardiovascular Research* 2012;94:237-45.
26. Heusch G. Nitroglycerin and delayed preconditioning in humans: yet another new mechanism for an old drug? *Circulation* 2001;103:2876-8.
27. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM et al. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:84-93.
28. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995;269:H2147-54.
29. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1551-60.
30. Guo Y, Flaherty MP, Wu WJ et al. Genetic background, gender, age, body temperature, and arterial blood pH have a major impact on myocardial infarct size in the mouse and need to be carefully measured and/or taken into account: results of a comprehensive analysis of determinants of infarct size in 1,074 mice. *Basic Res Cardiol* 2012;107:288.
31. Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Prog Cardiovasc Dis* 1988;31:57-77.
32. Pich S, Klein HH, Lindert S, Nebendahl K, Kreuzer H. Cell death in ischemic, reperfused porcine hearts: a histochemical and functional study. *Basic Res Cardiol* 1988;83:550-559.
33. Horneffer PJ, Healy B, Gott VL, Gardner TJ. The rapid evolution of a myocardial infarction in an end-artery coronary preparation. *Circulation* 1987;76:V39-V42.
34. Yang XM, Liu Y, Liu Y et al. Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 2010;105:119-128.
35. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979;40:633-44.
36. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz* 2008;33:88-100.
37. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V et al. Effect of Early Metoprolol on Infarct Size in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: The Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) Trial. *Circulation* 2013;128:1495-1503.
38. Hedstrom E, Engblom H, Frogner F et al. Infarct evolution in man studied in patients with first-time coronary occlusion in comparison to

- different species - implications for assessment of myocardial salvage. *J Cardiovasc Magn Reson* 2009;11:38.
39. Staat P, Rioufol G, Piot C et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-8.
 40. Piot C, Croisille P, Staat P et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-481.
 41. Schömig A, Mehilli J, Antoniucci D et al. Mechanical reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting more than 12 hours from symptom onset. A randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:2865-2872.
 42. Seller C, Stoller M, Pitt B, Meier P. The human coronary collateral circulation: development and clinical importance. *European Heart Journal* 2013;34:2674-82.
 43. Rezkalla SH, Kloner RA. Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena. *Nature Clin Pract Cardiovasc Med* 2004;1:96-102.
 44. Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 1998;78:1055-1085.
 45. Heusch G, Schulz R, Rahimtoola SH. Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H984-H999.
 46. Roubille F, Lairez O, Mewton N et al. Cardioprotection by clopidogrel in acute ST-elevated myocardial infarction patients: a retrospective analysis. *Basic Research in Cardiology* 2012;107:275.
 47. Suarez-Barrientos A, Lopez-Romero P, Vivas D et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart* 2011;97:970-6.
 48. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *The American journal of cardiology* 1983;52:72A-81A.
 49. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980;62:945-52.
 50. Miura T, Yellon DM, Hearse DJ, Downey JM. Determinants of infarct size during permanent occlusion of a coronary artery in the closed chest dog. *Journal of the American College of Cardiology* 1987;9:647-54.
 51. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-94.
 52. Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996;270:H1189-99.
 53. Heusch G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *British Journal of Pharmacology* 2008;153:1589-601.

54. Maroko PR, Libby P, Ginks WR et al. Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1972;51:2710-2716.
55. Ginks WR, Sybers HD, Maroko PR, Covell JW, Sobel BE, Ross Jr. J. Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest* 1972;51:2717-2723.
56. van de Werf F. The history of coronary reperfusion. *Eur Heart J* 2014;35:2510-2515.
57. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-9.
58. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:613-20.
59. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
60. Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1111-2.
61. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121-35.
62. Heusch G, Libby P, Gersh B et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* 2014;383:1933-43.
63. Eitel I, de Waha S, Wohrle J et al. Comprehensive Prognosis Assessment by CMR Imaging After ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2014;64:1217-26.
64. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;54:1496-1508.
65. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:281-92.
66. Bekkers SC, Yazdani SK, Virmani R, Waltenberger J. Microvascular obstruction: underlying pathophysiology and clinical diagnosis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1649-1660.
67. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation* 1989;80:1846-1861.
68. Reffelmann T, Kloner RA. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1099-H1107.
69. Rochitte CE, Lima JAC, Bluemke DA et al. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. *Circulation* 1998;98:1006-1014.

70. Mewton N, Thibault H, Roubille F et al. Postconditioning attenuates no-reflow in STEMI patients. *Basic Res Cardiol* 2013;108:383.
71. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch* 1981;393:287-297.
72. Gregorini L, Marco J, Kozáková M et al. α -Adrenergic blockade improves recovery of myocardial perfusion and function after coronary stenting in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:482-490.
73. Heusch G, Baumgart D, Camici P et al. α -Adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation* 2000;101:689-694.
74. Gregorini L, Marco J, Heusch G. Peri-interventional coronary vasomotion. *JMolCell Cardiol* 2012;52:883-889.
75. Heusch G, Kleinbongard P, Boese D et al. Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation* 2009;120:1822-1836.
76. Barrabes JA, Inserte J, Agullo L, Alonso A, Mirabet M, Garcia-Dorado D. Microvascular thrombosis: An exciting but elusive therapeutic target in reperfused acute myocardial infarction. *Cardiovasc HematolDisordDrug Targets* 2010;10:273-283.
77. Kleinbongard P, Baars T, Mohlenkamp S, Kahlert P, Erbel R, Heusch G. Aspirate from human stented native coronary arteries vs. saphenous vein grafts: more endothelin but less particulate debris. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H1222-H1229.
78. Kleinbongard P, Boese D, Baars T et al. Vasoconstrictor potential of coronary aspirate from patients undergoing stenting of saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its pharmacological attenuation. *Circ Res* 2011;108:344-352.
79. Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O. Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. *Am J Physiol* 1994;266:H1541-H1550.
80. Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A. Myocardial infarction and coronary microvascular obstruction: an intimate, but complicated relationship. *Basic Res Cardiol* 2013;108:380.
81. Skyschally A, Walter B, Heusch G. Coronary microembolization during early reperfusion: infarct extension, but protection by ischaemic postconditioning. *European Heart Journal* 2013;34:3314-21.
82. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002;97:268-275.
83. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LWV, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial

- cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980;62:945-952.
84. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983;68 (Suppl.I):I-8-I-15.
 85. Roberts CS, Schoen FJ, Kloner RA. Effect of coronary reperfusion on myocardial hemorrhage and infarct healing. *Am J Cardiol* 1983;52:610-614.
 86. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. *Circ Res* 1989;65:1045-1056.
 87. Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1995;268:H1531-9.
 88. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:365-71.
 89. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S644-S648.
 90. Inserte J, Hernando V, Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2012;96:23-31.
 91. Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana GJM, Garcia-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol* 1996;271:H428-H434.
 92. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell DeathDis* 2011;2:e244.
 93. Orogo AM, Gustafsson AB. Cell death in the myocardium: my heart won't go on. *IUBMBLife* 2013;65:651-656.
 94. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart FailRev* 2011;16:49-69.
 95. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the holy grail of cardioprotection. *Basic ResCardiol* 2010;105:151-154.
 96. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *NatMed* 2000;6:513-519.
 97. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 2003;93:292-301.
 98. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009;104:181-188.

99. Dong Y, Undyala VV, Gottlieb RA, Mentzer RM, jr., Przyklenk K. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *JCardiovascPharmacolTher* 2010;15:220-230.
100. Huang C, Andres AM, Ratliff EP, Hernandez G, Lee P, Gottlieb RA. Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PLoS ONE* 2011;6:e20975.
101. Przyklenk K, Undyala VV, Wider J, Sala-Mercado JA, Gottlieb RA, Mentzer RM, jr. Acute induction of autophagy as a novel strategy for cardioprotection: getting to the heart of the matter. *Autophagy* 2011;7:432-433.
102. Sala-Mercado JA, Wider J, Undyala VV et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2010;122:S179-S184.
103. Singh KK, Yanagawa B, Quan A et al. Autophagy gene fingerprint in human ischemia and reperfusion. *J ThoracCardiovasc Surg* 2014;147:1065-1072.
104. Gedik N, Thielmann M, Kottenberg E et al. No evidence for activated autophagy in left ventricular myocardium at early reperfusion with protection by remote ischemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *PLoS One* 2014;9:e96567.
105. Zhou W, Yuan J. SnapShot: Necroptosis. *Cell* 2014;158:464-464.
106. Oerlemans MI, Koudstaal S, Chamuleau SA, de Kleijn DP, Doevendans PA, Sluijter JP. Targeting cell death in the reperfused heart: Pharmacological approaches for cardioprotection. *Int J Cardiol* 2013;165:410-422.
107. DeWood MA, Spores J, Notske R et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980;303:897-902.
108. Chazov EI, Matveeva LS, Mazaev AV, Sargin KE, Sadovskaia GV, Ruda MI. [Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarct]. *Terapevticheskii Arkhiv* 1976;48:8-19.
109. Rentrop KP, Blanke H, Karsch KR et al. Acute myocardial infarction: intracoronary application of nitroglycerin and streptokinase. *Clinical Cardiology* 1979;2:354-63.
110. Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet* 1986;1:397-402.
111. Menees DS, Peterson ED, Wang Y et al. Door-to-balloon time and mortality among patients undergoing primary PCI. *the new england journal of medicine* 2013;369:901-9.
112. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators. *the new england journal of medicine* 1993;329:673-82.

113. Van De Werf F, Adgey J, Ardissino D et al. Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial. *Lancet* 1999;354:716-22.
114. Hartzler GO, Rutherford BD, McConahay DR et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty with and without thrombolytic therapy for treatment of acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 1983;106:965-73.
115. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13-20.
116. Sarno G, Lagerqvist B, Nilsson J et al. Stent thrombosis in new-generation drug-eluting stents in patients with STEMI undergoing primary PCI: a report from SCAAR. *Journal of the American College of Cardiology* 2014;64:16-24.
117. Pinto DS, Frederick PD, Chakrabarti AK et al. Benefit of transferring ST-segment-elevation myocardial infarction patients for percutaneous coronary intervention compared with administration of onsite fibrinolytic declines as delays increase. *Circulation* 2011;124:2512-21.
118. Armstrong PW, Gershlick AH, Goldstein P et al. Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation myocardial infarction. *the new england journal of medicine* 2013;368:1379-87.
119. Sinnaeve PR, Armstrong PW, Gershlick AH et al. STEMI Patients Randomized to a Pharmacologic Invasive Strategy or Primary PCI: The STREAM 1-Year Mortality Follow-Up. *Circulation* 2014;130:1139-1145.
120. Rapold HJ. Promotion of thrombin activity by thrombolytic therapy without simultaneous anticoagulation. *Lancet* 1990;335:481-2.
121. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1988;2:349-60.
122. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993;21:537-45.
123. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research* 2010;87:406-23.
124. Zahger D, Yano J, Chaux A, Fishbein MC, Ganz W. Absence of lethal reperfusion injury after 3 hours of reperfusion. A study in a single-canine-heart model of ischemia-reperfusion. *Circulation* 1995;91:2989-94.
125. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.

126. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther* 2007;116:173-91.
127. Staat P, Rioufol G, Piot C et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-2148.
128. Hahn JY, Song YB, Kim EK et al. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation* 2013;128:1889-96.
129. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893-9.
130. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010;375:727-34.
131. Sloth AD, Schmidt MR, Munk K et al. Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal* 2013;35:168-175.
132. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 2015;116:674-99.
133. Van de Werf F, Janssens L, Brzostek T et al. Short-term effects of early intravenous treatment with a beta-adrenergic blocking agent or a specific bradycardiac agent in patients with acute myocardial infarction receiving thrombolytic therapy. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:407-16.
134. Ibanez B, Prat-Gonzalez S, Speidl WS et al. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 2007;115:2909-16.
135. Ibanez B, Cimmino G, Prat-Gonzalez S et al. The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion. *Int J Cardiol* 2011;147:428-32.
136. Garcia-Prieto J, Fernandez-Jimenez R, Sreeramkumar V et al. 272Pre-reperfusion metoprolol administration reduces ischemia/reperfusion injury (IRI) through beta1-adrenergic receptor (b1AR) blockade in the circulating cells. *Cardiovascular Research* 2014;103 Suppl 1:S49.
137. Mateos A, Garcia-Lunar I, Garcia-Ruiz JM et al. Efficacy and safety of out-of-hospital intravenous metoprolol administration in anterior ST-segment elevation acute myocardial infarction: insights from the METOCARD-CNIC trial. *Ann Emerg Med* 2015;65:318-24.
138. Pizarro G, Fernandez-Friera L, Fuster V et al. Long-Term Benefit of Early Pre-Reperfusion Metoprolol Administration in Patients With Acute

- Myocardial Infarction: Results From the METOCARD-CNIC Trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction). *Journal of the American College of Cardiology* 2014;63:2356-62.
139. Chen ZM, Pan HC, Chen YP et al. Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;366:1622-32.
 140. Gersh BJ, Stone GW, White HD, Holmes DR, Jr. Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: is the slope of the curve the shape of the future? *Jama* 2005;293:979-86.
 141. Roolvink V, Rasoul S, Ottervanger JP et al. Rationale and design of a double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial of early administration of intravenous beta-blockers in patients with ST-elevation myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention: EARLY beta-blocker administration before primary PCI in patients with ST-elevation myocardial infarction trial. *Am Heart J* 2014;168:661-6.
 142. Antoniucci D. Block the Ischemia and Reperfusion Damage: An Old Adjunctive Drug for a New Reperfusion Strategy. *Journal of the American College of Cardiology* 2014;63:2363-4.
 143. Sodi-Pallares D, De Micheli A, Medrano G et al. [Effect of glucose-insulin-potassium solutions on the electrocardiogram in acute and chronic coronary insufficiency]. *Mal Cardiovasc* 1962;3:41-79.
 144. Selker HP, Beshansky JR, Sheehan PR et al. Out-of-hospital administration of intravenous glucose-insulin-potassium in patients with suspected acute coronary syndromes: the IMMEDIATE randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307:1925-33.
 145. Lonborg J, Vejlsstrup N, Kelbaek H et al. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *European Heart Journal* 2012;33:1491-9.
 146. Stone GW, Maehara A, Witzenbichler B et al. Intracoronary abciximab and aspiration thrombectomy in patients with large anterior myocardial infarction: the INFUSE-AMI randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2012;307:1817-26.
 147. Jones SP, Tang XL, Guo Y et al. The NHLBI-Sponsored Consortium for preclinical assessment of cARDioprotective Therapies (CAESAR): A New Paradigm for Rigorous, Accurate, and Reproducible Evaluation of Putative Infarct-Sparing Interventions in Mice, Rabbits, and Pigs. *Circ Res* 2015;116:572-86.
 148. Fernandez-Jimenez R, Ibanez B. CAESAR: One Step Beyond in the Construction of a Translational Bridge for Cardioprotection. *Circ Res* 2015;116:554-6.
 149. Desmet W, Bogaert J, Dubois C et al. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute ST-segment

- elevation myocardial infarction. *European Heart Journal* 2011;32:867-77.
150. Garcia-Dorado D, Garcia del Blanco B, I. O et al. Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled clinical trial. *Int J Cardiol* 2014;177:935-941.
 151. Janssens Sea. Nitric Oxide for inhalation to reduce reperfusion injury in acute STEMI. ESC meeting, Barcelona 2014.
 152. Siddiqi N, Neil C, Bruce M et al. Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *European Heart Journal* 2014;35:1255-62.
 153. Atar D, Arheden H, Berdeaux A et al. Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur Heart J* 2015;36:112-9.
 154. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996;98:556-62.
 155. Mahata SK, Zheng H, Mahata S, Liu X, Patel KP. Effect of heart failure on catecholamine granule morphology and storage in chromaffin cells. *J Endocrinol* 2016;230:309-23.
 156. Lefkowitz RJ, Haber E, O'Hara D. Identification of the cardiac beta-adrenergic receptor protein: solubilization and purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:2828-32.
 157. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991;43:203-42.
 158. Brodde OE. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 1993;60:405-30.
 159. Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000;101:558-69.
 160. He JQ, Balijepalli RC, Haworth RA, Kamp TJ. Crosstalk of beta-adrenergic receptor subtypes through Gi blunts beta-adrenergic stimulation of L-type Ca²⁺ channels in canine heart failure. *Circ Res* 2005;97:566-73.
 161. Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989;245:1118-21.
 162. Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn DA, Lefkowitz RJ. Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3665-9.
 163. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile

- response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001;103:1649-55.
164. Vij M, Drake MJ. Clinical use of the beta3 adrenoceptor agonist mirabegron in patients with overactive bladder syndrome. *Ther Adv Urol* 2015;7:241-8.
 165. Balligand JL. Cardiac salvage by tweaking with beta-3-adrenergic receptors. *Cardiovasc Res* 2016;111:128-33.
 166. Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation* 2004;110:948-54.
 167. Karimi Galougahi K, Liu CC, Garcia A et al. beta3-Adrenoceptor activation relieves oxidative inhibition of the cardiac Na⁺-K⁺ pump in hyperglycemia induced by insulin receptor blockade. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309:C286-95.
 168. Sorrentino SA, Doerries C, Manes C et al. Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional beta1-blockade. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:601-11.
 169. Garcia-Alvarez A, Pereda D, Garcia-Lunar I et al. Beta-3 adrenergic agonists reduce pulmonary vascular resistance and improve right ventricular performance in a porcine model of chronic pulmonary hypertension. *Basic Res Cardiol* 2016;111:49.
 170. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998;102:1377-84.
 171. Belge C, Hammond J, Dubois-Deruy E et al. Enhanced expression of beta3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation* 2014;129:451-62.
 172. Kruger M, Kotter S, Grutzner A et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 2009;104:87-94.
 173. Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, Ukai T, Sane DC, Cheng CP. Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res* 2001;89:599-606.
 174. Morimoto A, Hasegawa H, Cheng HJ, Little WC, Cheng CP. Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H2425-33.
 175. Donckier JE, Massart PE, Van Mechelen H, Heyndrickx GR, Gauthier C, Balligand JL. Cardiovascular effects of beta 3-adrenoceptor stimulation in perinephritic hypertension. *Eur J Clin Invest* 2001;31:681-9.

176. Bundgaard H, Liu CC, Garcia A et al. beta(3) adrenergic stimulation of the cardiac Na⁺-K⁺ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification. *Circulation* 2010;122:2699-708.
177. Maier LS. A novel mechanism for the treatment of angina, arrhythmias, and diastolic dysfunction: inhibition of late I(Na) using ranolazine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54:279-86.
178. Cypess AM, Lehman S, Williams G et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509-17.
179. Calvert JW, Condit ME, Aragon JP et al. Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res* 2011;108:1448-58.
180. Aragon JP, Condit ME, Bhushan S et al. Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;58:2683-91.
181. Garcia-Prieto J, Garcia-Ruiz JM, Sanz-Rosa D et al. beta3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology* 2014;109:422.
182. McAlindon E, Pufulete M, Lawton C, Angelini GD, Bucciarelli-Ducci C. Quantification of infarct size and myocardium at risk: evaluation of different techniques and its implications. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:738-46.
183. Rozec B, Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* 2006;111:652-73.
184. Sennitt MV, Kaumann AJ, Molenaar P et al. The contribution of classical (beta1/2-) and atypical beta-adrenoceptors to the stimulation of human white adipocyte lipolysis and right atrial appendage contraction by novel beta3-adrenoceptor agonists of differing selectivities. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1084-95.
185. Dolan JA, Muenkel HA, Burns MG et al. Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:1000-6.
186. Takasu T, Ukai M, Sato S et al. Effect of (R)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} acetanilide (YM178), a novel selective beta3-adrenoceptor agonist, on bladder function. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:642-7.
187. Garcia-Dorado D, Piper HM. Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res* 2006;69:1-3.

188. Van Allen NR, Krafft PR, Leitzke AS, Applegate RL, 2nd, Tang J, Zhang JH. The role of Volatile Anesthetics in Cardioprotection: a systematic review. *Med Gas Res* 2012; 2: 22.
189. Garcia-Ruiz JM, Fernandez-Jimenez R, Garcia-Alvarez A et al. Impact of the Timing of Metoprolol Administration During STEMI on Infarct Size and Ventricular Function. *J Am Coll Cardiol* 2016; 67: 2093-104.
190. Easterbrook PJ, Berlin JA, Gopalan R, Matthews DR. Publication bias in clinical research. *Lancet* 1991; 337: 867-72.
191. Luijendijk HJ, Koolman X. The incentive to publish negative studies: how beta-blockers and depression got stuck in the publication cycle. *J Clin Epidemiol* 2012; 65: 488-92.
192. Bundgaard H, Axelsson A, Hartvig Thomsen J et al. The first-in-man randomized trial of a beta3 adrenoceptor agonist in chronic heart failure: the BEAT-HF trial. *Eur J Heart Fail* 2017; 19: 566-575.